

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CO-EXPRESSION DE LA PRO-PROTÉINE CONVERTASE
SPC3 ET DU PRÉCURSEUR NEUROENDOCRINIEN PROSAAS**

Par

EDITH LANOUE

Département de Pharmacologie

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)**

Octobre 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74431-0

Canada

**Perseverance is not a long race;
It is many short races one after another.
Walter Elliott**

**À tous ceux qui m'ont poussée à persévérer
À Jean-Philippe qui m'y poussera sûrement encore**

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	V
LISTE DES ILLUSTRATIONS	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
RÉSUMÉ	XI
INTRODUCTION	1
1.1 LES PRO-PROTÉINES CONVERTASES	1
1.1.1 Historique	1
1.1.2 Les différentes convertases	4
1.1.3 Localisation des convertases	7
1.2 GRANINE	10
1.2.1 Définition d'une granine	10
1.2.2 Les granines dans la voie de sécrétion régulée	12
1.2.3 7B2	13
1.2.4 Interaction entre 7B2 et SPC2 dans la voie régulée	15
1.3 PROSAAS	16
1.3.1 Carboxypeptidases	17
1.3.2 Carboxypeptidase E et son mutant naturel : la souris <i>Cpe^{fat/fat}</i>	18
1.3.3 La découverte du peptide proSAAS	21

1.3.4	ProSAAS inhibiteur de convertases	24
1.4	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	25
MATÉRIEL ET MÉTHODES		27
2.1	MATÉRIEL GÉNÉRAL	27
2.2	HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	28
2.2.1	Lames Poly-L-lysine	28
2.2.2	Extraction, congélation et coupe de tissus de rat	28
2.2.3	ADN utilisés pour la préparation des ribosomes	29
2.2.4	Préparation des ribosomes pour proSAAS et SPC3 de rat	29
2.2.5	Hydrolyse de la ribosome pour proSAAS	31
2.2.6	Comptage de la radioactivité	31
2.2.7	Hybridation <i>in situ</i>	31
2.2.8	Co-localisation de proSAAS et SPC3	33
2.2.9	Immersion dans l'émulsion auto-radiographique	34
2.2.10	Analyse des résultats au microscope	36
2.3	PRODUCTION TRANSITOIRE DE PROSAAS ET SPC3 DANS LE SYSTÈME D.E.S.....	36
2.3.1	Clonage de proSAAS dans le vecteur de transfection pAc5.1/V5-His	36
2.3.2	Extraction d'ADN des clones obtenus par ligation.....	37
2.3.3	Séquençage manuel des clones positifs.....	38
2.3.4	Transfection transitoire de SPC3 de souris et proSAAS de rat	39
2.4	BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN.....	41
2.4.1	Lignées cellulaires.....	41
2.4.2	Extraction d'ARN de cellules	41

2.4.3	Dosage de l'ARN	42
2.4.4	Buvarpage de type Northern	42
2.4.5	Ribosondes pour la détection d'ARN par buvardage de type Northern.....	43
2.4.6	Hybridation des membranes	43
2.4.7	Dé-hybridation de la membrane.....	44
2.5	BUVARDAGE DE TYPE WESTERN	45
2.5.1	Buvarpage Western du contenu en protéines des milieux de transfection transitoire	45
2.5.2	Étude de blocage de SPC3 par buvardage de type Western	46
2.6	DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE SPC3 DE RAT	47
2.6.1	Essai enzymatique de SPC3 de rat sur les milieux de culture obtenus après transfection des cellules S2.....	47
	RÉSULTATS	48
3.1	LOCALISATION COMPARATIVE DE PROSAAS ET 7B2 DANS DES LIGNÉES CELLULAIRES	48
3.2	LOCALISATION DE SPC3 ET PROSAAS DANS LE CERVEAU DE RAT	50
3.3	CO-LOCALISATION CELLULAIRE DE SPC3 ET PROSAAS AU NIVEAU DU CERVEAU	55
3.4	LOCALISATION DE PROSAAS ET SPC3 DANS DIVERS TISSUS PÉRIPHÉRIQUES.....	57
3.5	TRANSFECTION DE PROSAAS ET SPC3 DANS LE SYSTÈME DES.....	61
3.5.1	Northern pour proSAAS et SPC3	61
3.5.2	Buvarpage de type Western du contenu en protéines sécrétées dans les milieux de culture des cellules S2 transfectées.....	62

3.5.3	Étude de blocage de l'anticorps anti-SPC3 avec de l'enzyme SPC3 purifiée.	
	66
3.5.4	Essais enzymatiques sur les milieux de culture des cellules S2 transfectées ..	
	66
DISCUSSION		69
CONCLUSIONS		78
REMERCIEMENTS		80
BIBLIOGRAPHIE		82

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

- LANOUE, E., DAY, R. (2001) Co-expression of Pro-Protein Convertase SPC3 and the Neuroendocrine Precursor ProSAAS. *Endocrinology* 142 (9): 4141-4149
- WEI, S., SEGURA, S., VENDRELL, J., AVILES, F.X., LANOUE, E., DAY, R., FENG, Y., FRICKER, L.D. (2002) Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J Biol Chem.* *sous presse*

Communications:

- LANOUE, E., FRICKER, L.D., DAY, R. (2000) Distribution and Co-expression of the Neuroendocrine Precursor ProSAAS and SPC3 in the Rat CNS. July 16-21, Gordon Research Conferences. Hormonal and Neural Peptide Biosynthesis. Colby-Sawyer College, New London, New Hampshire. Présentation par affichage
- LANOUE, E., THOMAS G., DAY, R. (1999) Distribution comparative de PACS-1 et PACS-2, deux protéines de triage cytosolique. 21-23 octobre, Club de Recherche Clinique du Québec (CRCQ), Montebello, Québec. Présentation par affichage. *Communication Journal Médecine/Sciences* Vol. 15 Supp 2:34

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Mode d'action des convertases	3
Figure 2. Représentation schématique des divers membres des convertases	6
Figure 3. Représentation graphique des peptides dérivés de proSAAS	22
Figure 4. Séquences en acides aminés pour proSAAS de rat, souris et humain.....	23
Figure 5. Mode de fonctionnement d'une double hybridation <i>in situ</i>	35
Figure 6. Schéma représentant le fonctionnement d'une transfection transitoire	40
Figure 7. Localisation de proSAAS et 7B2 dans des lignées cellulaires dérivées de cellules endocrines et non-endocrines	49
Figure 8. Distribution de proSAAS et SPC3 dans le cerveau de rat (coupe sagittale)....	52
Figure 9. Localisation dans le cerveau de rat de SPC3 et proSAAS (coupes transversales).....	53
Figure 10. Localisation comparative de proSAAS et SPC3 au SNC	54
Figure 11. Co-localisation de proSAAS et SPC3 chez le rat au niveau du cerveau	56
Figure 12. ProSAAS et SPC3 dans divers tissus périphériques endocrines	59
Figure 13. Position distincte de proSAAS et SPC3 dans l'iléon de rat.....	60

Figure 14. Buvar dage de type Northern représentant la présence des ARNm de proSAAS et SPC3 après transfection des cellules S2	63
Figure 15. Buvar dage de type Western de milieu de culture de cellules S2 avec l'anticorps anti-SPC3	64
Figure 16. Buvar dage de type Western de milieux de culture de cellules S2 avec ou sans blocage de l'anticorps anti-SPC3 de souris	65
Figure 17. Représentation de l'activité enzymatique relative de type convertase dans les divers milieux de culture bruts après transfection transitoire des cellules S2	68
Figure 18. Représentation hypothétique du mode d'action de proSAAS sur SPC3	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMC	Aminométhyl coumarin
Anti IgG-HRP	Anticorps anti-immunoglobuline-G couplé à la horserasish peroxidase
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine de sérum bovin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CgA	Chromogranine A
CPD	Carboxypeptidase D
CPE	Carboxypeptidase E
C-terminal	Carboxy-terminal
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DES	Drosophila expression system
Dig	Digoxigénine
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid

γ-LPH	gamma-lipotrophine
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulfonic acid
Hpc	Hippocampe
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
LB	Bouillon de culture Lennox L
N-terminal	Amino-terminal
NBT	Nitro blue tetrazolium
PAM	Peptidyl glycine α-amidating mono-oxygénase
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
POMC	Proopiomélanocortine
PVN	Noyau para-ventriculaire du thalamus
RE	Réticulum endoplasmique
RNase	Ribonucléase
S2	Cellules Schneider 2
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Sg	Sécrétogranine
SON	Noyau supraoptique
SPC	Convertase à pro-protéine de type subtilisine (subtilisin-like proprotein convertases)
TE	Tris-EDTA
TGN	Réseau trans-golgien (Trans-golgi network)

TRIS**tris (hydroxyméthyl) aminométhane**

RÉSUMÉ

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

CO-EXPRESSION DE LA PRO-PROTÉINE CONVERTASE SPC3 ET DU PRÉCURSEUR NEUROENDOCRINIEN PROSAAS

Par

EDITH LANOUE

Département de Pharmacologie
Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M. Sc.)

Les pro-protéines convertases de type subtilisine (SPCs) sont une famille d'enzymes de type sérine protéinases. Les convertases sont impliquées dans la maturation de diverses hormones et protéines sécrétées via leur clivage en C-terminal d'une paire de résidus d'acides aminés basiques de type (RXXR). Jusqu'à tout récemment, un seul inhibiteur naturel des convertases était connu, le neuropeptide 7B2. Ce neuropeptide démontre une activité hautement inhibitrice en son domaine C-terminal. Cette activité inhibitrice agit sur la convertase SPC2. Par contre, ce neuropeptide est également considéré comme bi-fonctionnel puisque son domaine N-terminal est important pour l'activation du potentiel enzymatique de SPC2. Un nouveau précurseur peptidique ressemblant aux granines, une famille de peptides impliqués dans le triage d'hormones et d'enzymes vers les voies de sécrétions, a récemment été identifié, caractérisé et nommé proSAAS. Ce peptide possède une activité spécifique inhibitrice sur SPC3 *in vitro*. Pour exercer une telle activité inhibitrice *in vivo*, il est important de démontrer que SPC3 et proSAAS sont co-localisés. Pour y arriver, nous avons étudié l'expression de proSAAS et SPC3 dans le système nerveux central de rat et divers tissus périphériques de type endocrinien et non-endocrinien. Cette expression a été étudiée par la méthode d'hybridation *in situ*. Nos résultats démontrent que tout comme 7B2, proSAAS est distribué de façon pan neuronal. En périphérie, proSAAS est un excellent marqueur des cellules endocriniennes. Nos études de double marquage ont permis de montrer que l'expression de SPC3 est pratiquement toujours accompagnée de celle de proSAAS. Par contre, l'expression de proSAAS est aussi retrouvée dans des cellules endocrines et des neurones n'exprimant pas SPC3 proposant la possibilité pour proSAAS d'avoir plusieurs fonctions autre que la modulation de l'expression de SPC3.

INTRODUCTION

1.1 Les pro-protéines convertases

1.1.1 Historique

Tout neuropeptide et toute hormone requièrent des modifications post-traductionnelles tels que clivage protéolytique, α -amidation et glycosylation pour atteindre leur maturité (BENNET 1991, BRADBURY et SMYTH 1991). Ces modifications sont nécessaires pour permettre à ces facteurs d'effectuer leur activité biologique à diverses cibles de l'organisme. Il y a une quinzaine d'années, une nouvelle endoprotéase fut découverte chez la levure. Cette endoprotéase, la Kex2, est une sérine protéase de la famille des subtilisines. Elle a d'abord été identifiée pour être nécessaire à la maturation, au site Lys-Arg, du facteur α -mating essentiel à la conjugaison des levures (JULIUS et al, 1984). D'autres études effectuées sur cette endoprotéase ont permis une avancée notoire dans la recherche sur les hormones et peptides de mammifères. En effet, il a par la suite été démontré que la Kex2 avait la capacité de cliver la proopiomélanocortine (POMC) en divers peptides hypophysaires tels que la γ -LPH et la β -endorphine (1-31) (THOMAS et al, 1988). Comme cette endopeptidase de levure permettait la maturation de précurseurs de mammifères, cela semblait évident que les mammifères devraient avoir leurs propres endopeptidases de type subtilisine. Des recherches à ce niveau ont permis de découvrir des homologues de l'endoprotéase Kex2

chez les mammifères. Ces homologues ont été identifiés en tant que séquences d'ADN homologues (FULLER et al, 1989) pour correspondre au gène *fur* préalablement identifié (VAN DEN OUWELAND et al, 1989, 1990). De plus, cette expérience de recherche de séquences homologues a permis d'identifier par PCR deux autres composés. Ces composés ont été groupés dans une famille qui a été nommée convertases à pro-protéines de type subtilisine (subtilisin-related pro-protein convertases (SPC)) où la furine est connue sous le nom de SPC1 et que les deux autres homologues ont été nommés SPC2 et SPC3. Ces enzymes font partie de la grande famille des sérines protéases mais sont hautement sélectives contrairement à d'autres membres de cette famille comme la trypsine et la chymotrypsine qui ne reconnaissent pas de séquence spécifique. Tout comme la Kex2, les SPCs sont caractérisées pour être des enzymes impliquées dans la maturation de pro-hormones et pro-peptides (STEINER, 1998). Ces peptides immatures sont reconnus par les convertases via un site de clivage protéolytique de type Lys/Arg- X_n -Arg où n est égal à 0,2,4, ou 6 acides aminés.(DEVI 1991; LINDBERG & HUTTON 1991). Les peptides sont clivés en C-terminal des sites basiques où l'on retrouve généralement une arginine et à l'occasion une lysine en position P1(SCHECHTER & BERGER 1967), soit à un acide aminé en N-terminal du site de clivage. L'activité de l'hormone ou peptide clivé sera établie après enlèvement des résidus basiques en carboxy-terminal (-COOH) par une carboxypeptidase spécifique à ce type de résidu (KEMMLER et al 1973). Cette peptidase sera plus tard identifiée et nommée carboxypeptidase E (CPE) (Voir description à la partie 1.3.2). Par contre, des études publiées récemment permettent de croire qu'une autre carboxypeptidase, identifiée par le groupe de FRICKER (XIN et al 1997), la carboxypeptidase D (CPD), un homologue structural de la CPE, aurait le même type d'action. Puisque le site

basique est enlevé du substrat par la CPE ou la CPD, celui-là est donc prêt à aller effectuer son activité biologique où il se doit après d'autres modifications post-traductionnelles secondaires telles que l'amidation par la peptidyl-glycine- α -amidating mono-oxygénase (PAM). Cette amidation va permettre d'améliorer l'activité des peptides neuroendocrines maturés à leur récepteur et/ou à retarder leur dégradation *in vivo* (MAINS et al 1995).

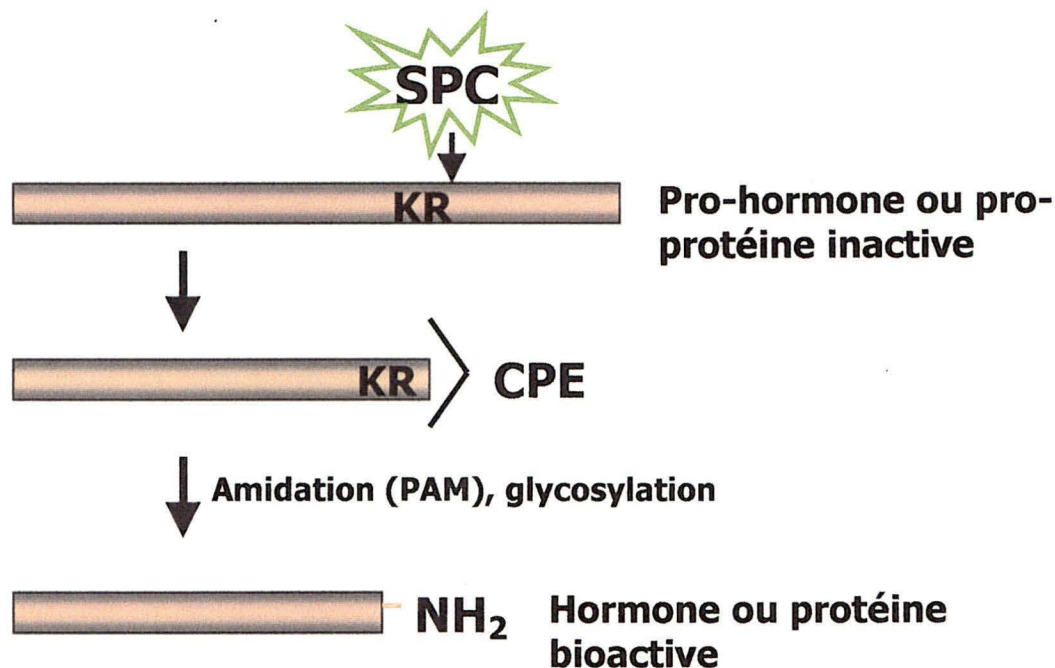


Figure 1. Mode d'action des convertases

Représentation schématique du fonctionnement des convertases de type subtilisine. La convertase reconnaît le site Lys-Arg (KR) et clive la pro-hormone ou pro-protéine. Ensuite la carboxypeptidase E (CPE) élimine le site basique (KR) en C-terminal. Finalement, la pro-hormone subit diverses modifications telles que l'amidation ou la glycosylation. Cela résulte en une hormone ou une protéine bio-active.

1.1.2 Les différentes convertases

Jusqu'à aujourd'hui, 7 membres de la famille des SPC ont été identifiés. Ils ont été nommés en fonction d'une nouvelle nomenclature proposée par le groupe de CHAN en 1992. Les convertases sont donc nommées comme suit (l'ancien nom utilisé étant indiqué entre parenthèse): SPC1 (furine/PACE) (ROEBROEK et al 1986), SPC2 (PC2) (SEIDAH et al, 1990 et 1991), SPC3 (PC1/PC3) (SEIDAH et al 1990, 1991 et SMEEKENS & STEINER 1991), SPC4 (PACE4) (KIEFER et al, 1991), SPC5 (PC4) (NAKAYAMA et al, 1992), SPC6 (PC5 ou PC6-A) (LUSSON et al 1993 et NAKAGAWA et al 1993), SPC7 (LPC ou PC7 ou PC8) (SEIDAH et al 1996 et BRUZZANITI et al, 1996). Chacun des membres possède une activité qui lui est propre. De plus, chaque convertase présente un domaine N-terminal très similaire et un domaine C-terminal variable aux autres membres de la famille. Pour le détail des différents domaines propres à chacune des convertases se rapporter à la Figure 2.

Les domaines conservés caractérisant le domaine N-terminal sont le peptide signal, le pro-segment, le domaine catalytique et le P-domaine. D'un autre côté, les domaines retrouvés dans le C-terminal sont entre autres des régions riches en cystéines, un domaine trans-membranaire et une queue cytosolique pour certains et un domaine amphiphatique pour d'autres et finalement un domaine de triage est retrouvé chez certaines convertases. Comme les SPCs sont synthétisées sous formes de pro-protéines larges et inactives, celles-ci doivent subir plusieurs modifications durant leur transition vers les diverses voies de sécrétion. Premièrement, une signal peptidase va enlever le peptide signal. Par la suite, le pro-segment, qui a pour fonction d'inhiber sa convertase

de façon compétitive de même que d'être chaperonne et de veiller au bon repliement de la protéine, est lui aussi clivé. La scission de ce pro-segment se fait par un mécanisme auto-catalytique (LEDUC et al, 1992; CREEMERS et al, 1993; GOODMAN ET GORMAN 1994; MATTHEWS et al, 1994; LAMANGO et al, 1999).

Les diverses convertases possèdent un domaine catalytique contenant un site actif caractérisé par une triade spécifique d'acides aminés. Cette triade typique aux sérines protéases apparentées à la subtilisine contient les 3 acides aminés suivants : aspartate (Asp), histidine (His) et sérine (Ser). Chaque convertase (sauf SPC2 qui contient une aspartate (Asp)) contient également un résidu asparagine (Asn) conservé et nécessaire à la stabilisation de la poche oxyanionique formé transitoirement durant la réaction d'hydrolyse de la convertase. Un autre domaine hautement conservé parmi les convertases, le P domaine, également connu sous le nom d'Homo B domaine est essentiel au bon repliement et à la stabilité de l'enzyme. (ZHOU et al 1998, TAKAHASHI et al, 1993, 1995).

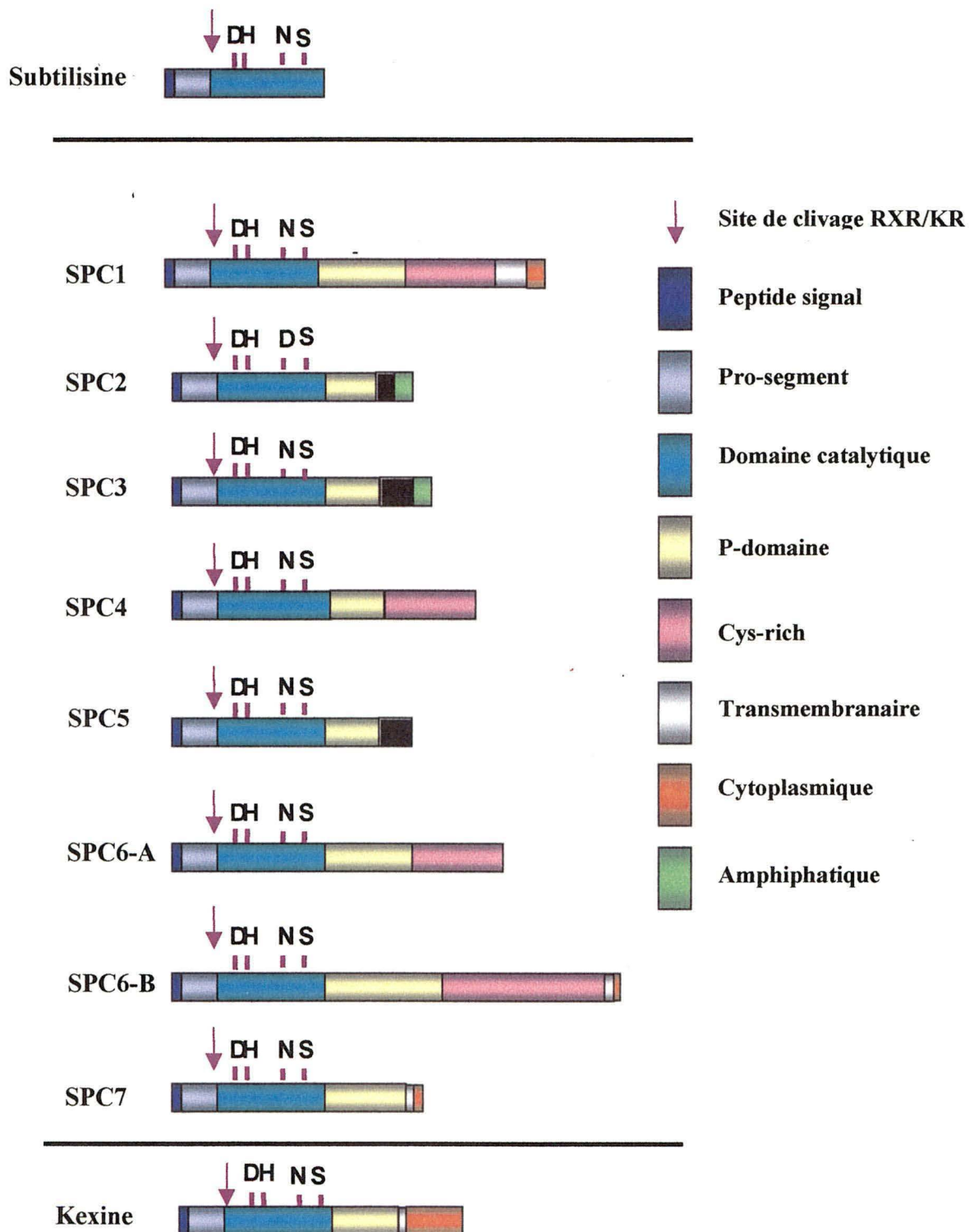


Figure 2. Représentation schématique des divers membres des convertases

Représentation graphique des divers membres de la famille des convertases apparentés à la subtilisine (haut) et la kexine de levure (bas) ainsi que leurs principaux domaines. (Tiré de BERGERON et al., 2000)

Le domaine C-terminal des convertases est beaucoup plus variable. En fait, chaque convertase a un patron différent des autres lui permettant d'avoir des sites d'action différents ou encore des actions différentes. Dans cette région de l'enzyme, on retrouve entre autres chez certaines convertases, telles que SPC1 (VAN DE VEN et al 1990), SPC4 (KIEFER et al 1991) et SPC6 (LUSSON et al 1993), un domaine riche en cystéine dont le rôle est inconnu, mais qui présente une homologie au récepteur des précurseurs de protéine tyrosine kinase (BERGERON et al 2000). On retrouve dans cette région un domaine trans-membranaire avec une queue cytoplasmique chez les convertases SPC1, SPC4, SPC6B et SPC7. Ce domaine serait responsable du triage cellulaire et a été le mieux étudié dans le cas de SPC1 (MOLLOY et al 1999). Dans le cas de SPC2 et SPC3, on ne retrouve pas de domaine trans-membranaire. On retrouve plutôt un domaine caractérisé par une hélice amphiphatique dont le rôle hypothétique consisterait à médier des interactions hydrophobes avec la membrane (SEIDAH et al 1990).

1.1.3 Localisation des convertases

Afin de déterminer le rôle des différents membres de la famille des convertases, des études de localisation ont été effectuées. Ces études ont été faites dans le but de déterminer les niveaux d'expression des ARNm par buvardage de type Northern, réalisés sur des ARNm purifiés à partir d'homogénats de tissus, ou par la localisation de ces mêmes ARNm directement au niveau des cellules de ces tissus par hybridation *in situ*. De plus, d'autres groupes ont déterminé la localisation des protéines dans les tissus par immunohistochimie.

Les recherches de ces divers groupes ont permis de constater la présence des diverses convertases à plusieurs niveaux de l'organisme (DAY et al. 1992; 1993; SCHAFER et al. 1993; SEIDAH et al. 1994; DONG et al 1995; 1997; SEIDEL et al 1998). Chaque cellule exprime au moins un type de convertase, mais, de façon plus précise, chaque cellule exprime un mélange particulier dont généralement au moins deux types de convertase. En fait, chaque type de convertase a une distribution qui lui est propre. Cette distribution autant tissulaire qu'au niveau cellulaire permet de faire un parallèle plus approfondi avec les cibles potentielles de ces enzymes. Une convertase peut avoir une très bonne activité enzymatique sur un précurseur hormonal *in vitro*, mais si ce précurseur n'est pas retrouvé *in vivo* dans une même cellule que l'enzyme étudiée, il apparaît peu probable que ce précurseur soit un réel substrat de cette convertase dans un organisme. En comparant les distributions de chacune des convertases dans le cerveau, on peut voir que certaines convertases sont exclusivement localisées au niveau de neurones (SPC2, SPC3 et SPC6) tandis que d'autres le sont autant au niveau de neurones que dans les cellules gliales (SPC1, SPC4 et SPC7) (BERGERON et al. 2000). Il est connu que les cellules gliales ne possèdent que la voie de sécrétion constitutive tandis que les neurones utilisent autant la voie constitutive que régulée de sécrétion. Par contre, si on étend cette distribution à l'organisme entier, on peut sous-diviser la famille des convertases en 4 groupes. Le premier dans lequel on retrouve SPC1 et SPC7 est ubiquitaire, mais à divers niveaux d'expression selon le tissu. De plus, ces deux enzymes sont retrouvées plus précisément dans la voie de sécrétion constitutive. Pour ce qui est de SPC2 et SPC3 qui font partie du deuxième groupe, on les retrouve dans les cellules neuronales de même que dans les cellules endocrines telles que dans les îlots de Langerhans du pancréas, des cellules chromaffines de la médullosurrénale ainsi que dans

les cellules mélanotrophes de l'hypophyse (DAY et al. 1992). Cette localisation leur permet d'être impliquées dans la maturation d'hormones, peptides et neurotransmetteurs sécrétés via les différents systèmes sécrétoires. Le troisième groupe constitué de SPC4 et SPC6 a une distribution qui ressemble beaucoup à celle observée pour SPC1 et SPC7 quoique beaucoup moins large. De plus, ces deux convertases sont retrouvées autant au niveau de la voie régulée de sécrétion que de la voie constitutive contrairement au premier groupe. Une dernière convertase, SPC5, a une distribution beaucoup plus restreinte que toutes les autres, elle n'est retrouvée qu'au niveau des cellules germinales testiculaires (SEIDAH et al 1994).

Certaines des convertases sont impliquées dans la maturation de produits de sécrétions constitutives dont SPC1. Cette convertase est notamment impliquée dans la maturation de plusieurs composés tels que des protéines virales et du plasma, des toxines, des récepteurs, certaines hormones et facteurs de croissance (DENAULT & LEDUC 1996). D'autres convertases sont retrouvées dans la voie de sécrétion régulée, notamment SPC2 et SPC3. Ces enzymes sont reconnues pour voir à la maturation de pro-hormones telles que la POMC (BENJANNET et al, 1991; THOMAS et al, 1991), la pro-insuline (BENNETT et al, 1992) le pro-glucagon (ROUILLE et al, 1995) et la prodynorphine (DUPUY et al, 1994; DAY et al, 1998).

1.2 Granine

1.2.1 Définition d'une granine

Chez les cellules de mammifères, il existe deux types de voies de sécrétion: la sécrétion constitutive et la sécrétion régulée (BURGESS & KELLY 1987). La source de ces deux types de voies se retrouve au niveau du réseau trans-golgien (TGN). Dans la voie constitutive, les produits de sécrétion tels que protéoglycans et glycoprotéines de la matrice extracellulaire, sont groupés dans des petites vésicules. De plus, cette voie de sécrétion est retrouvée dans tous les types de cellules. Par opposition, la sécrétion régulée est beaucoup plus restreinte. On la retrouve seulement dans des cellules sécrétrices différenciées. Cette sécrétion est médiée par des granules de sécrétion beaucoup plus spécialisés dans lesquels on retrouve plus souvent des hormones, des neuropeptides et des enzymes. Ces enzymes étant principalement des enzymes digestives sécrétées par les glandes salivaires, l'estomac et le pancréas exocrine via la voie de sécrétion régulée sous contrôle hormonal et/ou nerveux.

Des études ont démontré que la famille des granines joue un rôle important dans le triage des divers produits emmagasinés et dirigés vers les voies de sécrétion au TGN. On retrouve les divers membres des granines au niveau des granules de sécrétion d'une grande variété de cellules endocrines et de neurones. Ces granines sont emmagasinées avec diverses hormones et neuropeptides (HUTTNER et al, 1991). Des études de caractérisation de certains types de cellules endocrines telles que les cellules chromaffines, les cellules parathyroïdes et les cellules de l'adénohypophyse ont permis

de découvrir les 3 premiers membres de cette famille. Tout d'abord, la chromogranine A (CgA) originalement caractérisée comme une protéine d'environ 75-85000 kDa retrouvée dans la médullosurrénale bovine (SCHNEIDER et al, 1967). Par la suite, un deuxième membre fut identifié et nommé sécrétogranine II (SgII). Celle-ci est une protéine sulfatée désignée ainsi grâce à son activité sécrétoire dans l'hypophyse antérieure bovine (ZANINI A & ROSA 1981 et ROSA & ZANINI 1981). Finalement, un troisième membre caractérisé par une protéine sécrétoire sulfatée sur les tyrosines et retrouvée dans des cellules dérivées de la médullosurrénale, les cellules PC12, fut appelé chromogranine B (CgB) (LEE & HUTTNER 1983). Depuis, d'autres membres ont été reconnus comme membres de cette famille tels que le produit du gène *1B1075* (sécrétogranine III) (OTTIGER et al, 1990), l'antigène HISL-19 (sécrétogranine IV) (KRISCH et al, 1988) et finalement le peptide 7B2 nommé aussi sécrétogranine V (SgV). (MARCINKIEWICZ et al, 1986).

Du point de vue de la séquence primaire des différentes granines, il est connu que seules les chromogranines A et B sont apparentées (WIEDENMANN & HUTTNER 1989). Les deux granines contiennent une structure en boucle retenue par des ponts disulfures près du site amino-terminal et une autre séquence homologue en carboxy-terminal. Par contre, les granines sont regroupées dans une famille pour leurs propriétés. En fait, les granines sont des protéines hautement hydrophiles excepté pour le peptide signal. Elles ont plusieurs régions d'acides aminés chargés surtout acides (OTTIGER et al, 1990). De plus, ces peptides sont stables à la chaleur, ont un point isoélectrique très bas et possèdent la capacité de se lier au calcium (WIEDENMANN & HUTTNER 1989). Ces dernières fonctions sont impliquées dans le mécanisme par lequel les

granines sont triées dans les granules de sécrétion. Finalement, toutes les granines identifiées sont reliées entre elles par le fait qu'elles possèdent dans leur séquence deux ou plusieurs résidus basiques adjacents qui sont des sites potentiels pour le clivage protéolytique en peptides plus petits et actifs biologiquement (OTTIGER et al 1990). Les protéases impliquées dans le clivage des granines en plus petits peptides aux sites basiques sont probablement les SPCs, et plus particulièrement les convertases SPC2 et SPC3 puisqu'il est déjà connu que ces deux enzymes sont retrouvées au niveau des cellules neuroendocrines et triées vers les granules de sécrétion de la voie régulée. Cette hypothèse de clivage est également appuyée par le fait que les granines et les convertases de type SPCs résident dans le même compartiment intracellulaire (NATORI & HUTTNER 1994). De plus, les agrégats formés par les granines dans le réseau trans-golgien et dans les granules de sécrétion se font sous des conditions de pH et de calcium identiques à celles qui permettent une augmentation de l'activité convertase des SPCs qui seraient impliquées dans leur maturation.

1.2.2 Les granines dans la voie de sécrétion régulée

Comme les granines sont exclusivement retrouvées dans des cellules possédant la voie de sécrétion régulée, et donc, au niveau de cellules endocrines et neuroendocrines, ils peuvent être des candidats importants dans l'étude de cette voie de sécrétion. Les granines peuvent donc être un modèle très utile de protéines dans l'étude de la formation des granules de sécrétion puisqu'elles ont permis d'élucider plusieurs données importantes dans le mécanisme de formation de ces granules (HUTTNER et al, 1991).

Bien que le rôle des granines reste nébuleux, certains groupes leur ont attribué certaines fonctions potentielles. Les granines seraient impliquées dans l'apparition de produits de maturation issus de la voie de sécrétion régulée. Au niveau intracellulaire, elles permettraient le recrutement de certaines pro-hormones et pro-neuropeptides dans les granules de sécrétion. De plus, elles moduleraient la maturation des hormones et des neuropeptides probablement dû à leurs sites basiques qui pourraient servir de substrat compétitif sur les enzymes protéolytiques. Leur rôle au niveau extracellulaire semble porter sur la possibilité des granines d'être des précurseurs de neuropeptides. Des études antérieures ont démontré que la Cg A est précurseur de la pancréastatine et de la chromostatine. Ces deux peptides seraient respectivement responsables de l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et responsable de l'inhibition de l'exocytose des cellules chromaffines isolées. De nos jours, les granines sont utilisées à titre de marqueurs des cellules neuroendocrines puisqu'elles y sont toutes retrouvées sous diverses combinaisons (HUTTNER et al, 1991; CETIN & GRUBE 1991).

1.2.3 7B2

Dans l'étude des convertases, un membre des granines retient l'attention. Cette granine, 7B2 (sécrétogranine V), originalement purifié en 1982 (HSI et al, 1982) comme protéine spécifique de type neuroendocrine, est reconnue depuis 1994 comme une protéine de liaison spécifique à la convertase SPC2 (BRAKS & MARTENS 1994). 7B2 est un précurseur protéinique clivé au TGN (AYOUBI et al, 1990; PAQUET et al, 1991) et probablement clivé par une enzyme de type SPC1-like (PAQUET et al, 1994). Ce précurseur peptidique est ainsi clivé en deux sections : un fragment correspondant à la

partie amino-terminale de 151 acides aminés (21 kDa, nommé 7B2) et un domaine carboxy-terminal (C-T peptide). Jusqu'à la reconnaissance de son interaction avec la forme précurseur (proSPC2) de la convertase SPC2 (BRAKS & MARTENS 1994), aucune activité lui était attribuée. Il fut démontré que 7B2 intact, de même que le C-T peptide, sont des inhibiteurs dans l'ordre du nanomolaire de SPC2 immunopurifié (BRAKS & MARTENS 1994; LINDBERG et al, 1995; BRAKS et al 1996). Il a été reconnu que le C-T peptide est un inhibiteur spécifique de SPC2 avec un IC_{50} d'environ 50 nM (LINDBERG et al, 1995; MARTENS et al 1994). En ce qui a trait au domaine de 21 kDa, il a été reconnu que ce fragment contient des domaines structuraux déterminant impliqués dans l'association avec le proPC2 (ZHU & LINDBERG 1995). Ce 21 kDa contient en effet un segment riche en proline (PPNPCP résidus 90-95) probablement impliqué dans cette liaison. Par contre, au départ, 7B2 fut originalement proposé pour être une chaperonne dû à son homologie avec la chaperonne 60 (BRAKS & MARTENS 1994) puisqu'il lie le proSPC2 dans le réticulum endoplasmique (RE) (MULLER et al, 1997; BRAKS et al, 1996; BENJANNET et al, 1995). Par la suite, des points contre cette option ont été émis tel que le fait que 7B2 n'est pas retenu au RE, mais plutôt sécrété (ZHU & LINDBERG 1995). De plus, il a été démontré que le repliement du proSPC2 précède sa liaison avec 7B2 et que la co-expression de 7B2 avec proSPC2 ne modifie pas son patron de résistance à la digestion par la N-Glycanase (MULLER et al, 1997). Toutes ces raisons supportent la notion que SPC2 doit se replier avant de se lier à 7B2 et écarte ainsi la possibilité pour 7B2 d'être bel et bien chaperonne.

1.2.4 Interaction entre 7B2 et SPC2 dans la voie régulée

Comme toutes granines, 7B2 est entreposé dans les granules de sécrétion et relâché par la voie de sécrétion régulée (IGUCHI et al, 1984; MARCINKIEWICZ et al, 1987; VIEAU et al, 1991). De plus, comme le 21 kDa, le C-T peptide est dirigé aux granules où il est entreposé (SIGAFOOS et al 1993, VAN HORSSSEN et al, 1995, ZHU et al 1996). Ceci suggérait que la présence d'un inhibiteur endogène de SPC2 dans les granules pouvait procurer un système régulateur spécifique à cette enzyme. Pour appuyer cette hypothèse, cela nécessitait une étude de localisation comparative entre le 7B2 et SPC2. Ces études *in vivo* ont permis de démontrer que 7B2 et SPC2 sont clairement co-localisés dans les neurones du cerveau de rat (SEIDEL et al, 1998). Il a également été révélé que 7B2 a une distribution plus large que SPC2 puisque plusieurs neurones exprimant 7B2 n'expriment pas SPC2. Ceci permet de croire en la possibilité réelle d'une interaction *in vivo* entre 7B2 et SPC2 puisqu'ils sont co-localisés.

Tel que dit plus haut, le peptide 7B2 entre en association au niveau du réticulum endoplasmique même s'il n'est pas chaperonne de SPC2. Il existe un modèle hypothétique concernant cette association entre le 7B2 et le proSPC2 (MULLER & LINDBERG 1999). Tout d'abord, le proSPC2 se replie lentement au niveau du RE après glycosilation. Par la suite, le 7B2 se lie au proSPC2 lorsque la conformation de celui-ci est atteinte. Ainsi, le complexe formé est transporté au golgi où les oligosaccharides du proSPC2 mûrent en acquérant une résistance à l'endoglycosidase H. Ensuite, le complexe atteint le TGN où chacune des deux protéines est sulfatée. Finalement, le 7B2 est clivé par une enzyme possédant une activité SPC1-like. De plus,

le pro-peptide de SPC2 est clivé et le C-T peptide accède au site occupé préalablement par le pro-peptide pour empêcher l'activité enzymatique de SPC2. En dernier lieu, le C-T peptide est clivé dans un site interne par SPC2 (ZHU et al 1996) de façon très lente. Cela explique le fait qu'il a une demi-vie de plusieurs heures. L'action inhibitrice de 7B2 est terminée lorsque la carboxypeptidase E élimine les résidus basiques en C-terminal annulant ainsi cette action inhibitrice sur SPC2. Le contrôle qu'exerce le C-T peptide sur SPC2 n'est pas tout à fait clair, mais il semble qu'il pourrait servir de contrôle pour que SPC2 s'active au niveau des granules immatures plutôt que matures.

1.3 ProSAAS

Grâce à une technique permettant l'isolation de substrats potentiels de la carboxypeptidase E, un nouveau peptide fut identifié par le groupe de L.D.FRICKER (FRICKER et al, 2000). Ce peptide, nommé proSAAS, fut découvert à l'aide d'un type de souris mutante pour la CPE et communément appelé *Cpe^{fat/fat}*. Chez ce type de souris, les substrats de la CPE se retrouvent avec un ou plusieurs acides aminés basiques en C-terminal puisque la CPE y est non-fonctionnelle. C'est d'ailleurs grâce à une extension basique retrouvée en C-terminal que le peptide proSAAS fut découvert. Il apparaît donc important d'approfondir le sujet des carboxypeptidases avant de plonger au cœur du sujet « proSAAS » afin de mieux comprendre comment la découverte de ce dernier a pu être faite.

1.3.1 Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des enzymes impliquées dans plusieurs mécanismes physiologiques importants. Ce sont des enzymes responsables de l'élimination d'acides aminés du domaine C-terminal de protéines et peptides par hydrolyse. Un groupe de cette famille, les métallo-carboxypeptidases sont des enzymes qui utilisent un site actif sérine, cystéine ou zinc pour fonctionner. Jusqu'à aujourd'hui, 13 membres sont connus et, grâce au séquençage du génome humain plusieurs gènes de type carboxypeptidase, ont été identifiés et pourraient être potentiellement producteur de carboxypeptidases actives. Les carboxypeptidases sont divisées en deux sous-groupes. Un premier groupe englobe les enzymes digestives soit les carboxypeptidase A et B (CPA et CPB). Ces carboxypeptidases sont impliquées dans la digestion de la nourriture et ont leur activité optimale à des pH neutres tel que retrouvé dans le milieu digestif (AULD 1998a; AULD 1998b; HENDRIKS 1998; SPRINGMAN 1998; AVILES & VENDRELL 1998). L'autre sous-groupe inclue la famille des CPE et regroupe plus précisément les carboxypeptidases D, E, M et N. Ce sous-groupe possède des enzymes qui sont hautement sélectives et semblent jouer un rôle dans la maturation de peptides intracellulaires. De plus, grâce à leur très grande spécificité et leur compartimentalisation dans les voies de sécrétion, ces enzymes préviennent le clivage inapproprié qui pourrait en d'autres cas endommager la cellule. D'autres gènes de types métallo-carboxypeptidases ont été nommés et caractérisés, mais ne codent pour aucune enzyme active, soit les carboxypeptidases X1, X2 et AEBP1/ACLP.

1.3.2 Carboxypeptidase E et son mutant naturel : la souris *Cpe^{fas/fat}*

La carboxypeptidase E est un membre de la famille des métallo-carboxypeptidase (FRICKER 1988). Cette enzyme connue également sous le nom de carboxypeptidase H (CPH), a été originalement associée à la production d'enképhaline dans la médullosurrénale (FRICKER & SNYDER 1982) et nommée convertase d'enképhaline (EC 3.4.17.10). La CPE a une distribution neuroendocrine (SCHAFER & DAY 1994; ZHENG et al 1994) et est l'enzyme majeure responsable du clivage en C-terminal d'une majorité d'hormones et neuropeptides (FRICKER 1991). La carboxypeptidase E aura cette action au niveau de la voie de sécrétion régulée dans les granules de sécrétion. Cette fonction caractéristique sera la même peu importe le tissu où la carboxypeptidase est exprimée. La carboxypeptidase E est retrouvée sous deux formes différentes. L'une soluble, tandis que l'autre est attachée à la membrane (SUPATTAPONE et al 1984). Bien que ces deux formes aient des poids moléculaires légèrement différents, elles ont exactement les mêmes propriétés enzymatiques. De plus, la forme soluble et la forme attachée à la membrane proviennent d'un même gène.

De nos jours la recherche s'intéresse énormément à la production d'animaux dits « knock-out » dans le but d'étudier le rôle de certaines protéines, enzymes ou même de gènes. Cette technique permet de déterminer quelles pourraient être les conséquences d'une déficience en telle ou telle protéine. Dans le cas de la CPE, cette technique ne fut pas nécessaire pour étudier une absence de cette carboxypeptidase. La mutation *Cpe^{fas/fat}*

apparut originalement dans une colonie de souris HRS/J en 1974 (COLEMAN & EICHER 1990). Le phénotype observé chez ces souris consistait en un taux élevé d'insuline plasmatique et l'apparition d'obésité franche après la puberté. Comme l'obésité n'était pas suivie de diabète, cette mutation fut nommée *fat*. Le gène codant pour la CPE (*Cpe*) fut plus tard cartographié au chromosome 8 (PROCHAZKA et al, 1991). Comme la mutation récessive était localisée au chromosome 8, il fut par la suite déterminé que la mutation non-sens caractérisée par le phénotype *fat* était localisée dans le gène *Cpe* codant pour la carboxypeptidase E. Cette mutation change la Ser²⁰² en Pro²⁰² (729TCT→729CCT) (NAGGERT et al, 1995). Avec cette mutation, la CPE n'a aucune activité enzymatique et n'est pas sécrétée dans le milieu. Par contre, la CPE est transcrite, mais la protéine mutante est dégradée rapidement au RE à cause de la mutation Ser²⁰² → Pro²⁰² dans une région hautement conservée de l'enzyme. Les souris désormais appelée *Cpe^{fat/fat}* résultent en une accumulation de peptides avec des extensions basiques en C-terminal, signe d'une déficience dans l'enlèvement de ces acides aminés par la carboxypeptidase E. (NAGGERT et al, 1995; FRICKER et al, 1996; UDUPI et al, 1997). Ces souris présentent tout de même une activité de type CPE mais n'est pas due à la CPE puisqu'aucune forme immunoréactive de CPE est retrouvée dans les souris *fat/fat* (FRICKER et al, 1996). Il s'agirait plutôt de la carboxypeptidase D (CPD) qui contribuerait à cette activité. Celle-ci compense partiellement parce que ses niveaux d'expression au cerveau sont plus bas que la CPE (SONG & FRICKER 1995). De plus, la CPD est principalement présente au réseau trans-golgien et non dans la voie de sécrétion tardive, là où la majorité de la maturation effectuée par la CPE se produit (VARLAMOV & FRICKER 1998; VARLAMOV et al 1999). Il serait donc

possible que d'autres carboxypeptidases contribuent à la maturation. Le principal problème observé chez ces mutants *Cpe^{fa/fa}* reste donc l'accumulation d'un taux élevé d'intermédiaires (Voir Tableau 1) avec une extension basique alors que ces intermédiaires sont pratiquement inexistantes chez les souris normales (NAGGERT et al, 1995; FRICKER et al, 1996; ROVERE et al, 1996). De plus, ces souris manifestent un mauvais fonctionnement du processus d'endoprotéolyse par l'accumulation de précurseurs (NAGGERT et al, 1995; FRICKER et al, 1996; ROVERE et al, 1996, FRICKER & LEITER 1999). Comme il est connu que la CPE débarrasse le C-terminal basique de 7B2 après son clivage interne par la convertase SPC2 et élimine son inhibition sur cette convertase (ZHU et al, 1996). Cela expliquerait entre autres pourquoi certains précurseurs et pro-hormones ne sont pas maturés chez les souris *Cpe^{fa/fa}*.

Tableau 1:

Liste partielle d'hormones endocrines présumées nécessiter une maturation par la CPE (tiré de LEITER, 1997)

Insuline	NAGGERT et al., 1995
Proopiomélanocortine (POMC)	COOL et al., 1997
Oxytocine-Vasopressine	ROUILLE et STEINER (non-publié)
Hormone de relâche des Gonadotropines (GRH)	WETSEL et al 1996
Cholécystokinine (CCK)	G GREELEY (non-publié)
Gastrine	UDUPI et al 1997
Enképhaline	FRICKER et al 1996
Dynorphine	FRICKER et al 1996
Neurotensine	ROVERE et al 1996

Les affirmations non-publiées sont des communications personnelles à l'auteur LEITER. (LEITER, 1997)

1.3.3 La découverte du peptide proSAAS

Récemment un nouveau peptide apparenté aux granines a été identifié par le groupe de Lloyd Fricker (FRICKER et al., 2000). Cette étude avait pour but de trouver des substrats de la carboxypeptidase E en utilisant un mutant naturel de la CPE, les souris *Cpe^{faul/fat}*, chez qui les substrats de la CPE se retrouvent avec un site basique en C-terminal qui n'est pas enlevé par la CPE. L'analyse de séquences par spectrométrie de masse des peptides les plus abondants retrouvés dans des extraits de cerveaux de souris *Cpe^{faul/fat}* a permis d'identifier des douzaines de composés. Parmi ceux-ci, on retrouve des intermédiaires de neuropeptides ainsi que des fragments de protéines retrouvées dans la voie de sécrétion telle que la chromogranine A, la chromogranine B et la sécrétogranine II. Cette technique consiste à isoler des composants avec des résidus Arg ou Lys en C-terminal par chromatographie d'affinité sur une colonne anhydrotrypsine qui est très sélective pour ces résidus. Cette technique a permis l'identification de 5 nouveaux peptides qui sont des substrats pour la CPE basée sur leur accumulation dans les cerveaux de souris *Cpe^{faul/fat}* comparés à des cerveaux de souris contrôles (FRICKER et al, 2000). Le clonage des ADN complémentaires de ces peptides a permis de déterminer que ces 5 peptides sont encodés par un même précurseur. Ce précurseur fut nommé proSAAS puisqu'un des peptides dérivés du cerveau de souris *Cpe^{faul/fat}* contient la séquence déduite en acides aminés Ser-Ala-Ala-Ser (SAAS) (FRICKER et al, 2000). Puisque la fonction des peptides identifiés était inconnue, ils ont été nommés en fonction d'une partie de leur séquence en acides aminés : SAAS, KEP, PEN et LEN (Figure 3). Parmi ces peptides identifiés, certains se sont révélés être des homologues de peptides bovins précédemment identifiés (SIGAFOOS et al 1993).

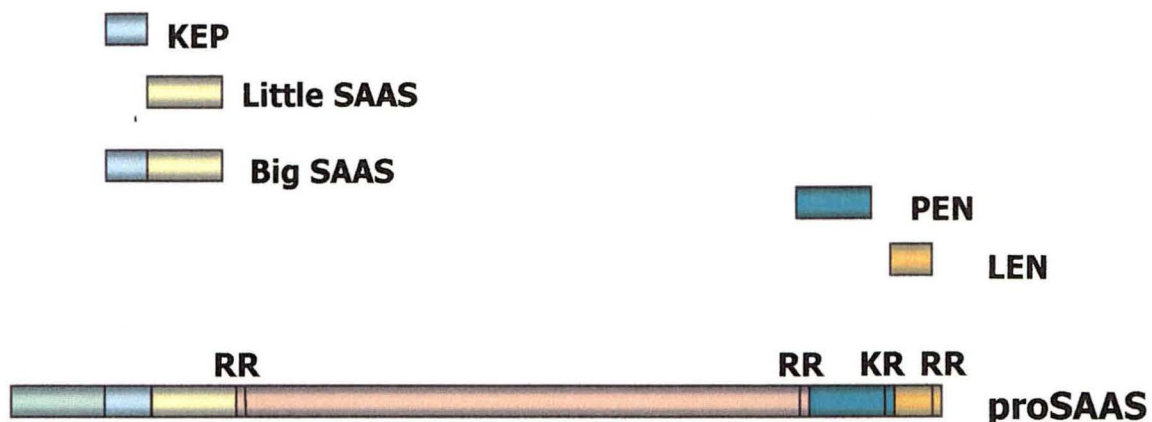


Figure 3. Représentation graphique des peptides dérivés de proSAAS

Représentation schématique des différents peptides dérivés du précurseur proSAAS (au bas). En partie amino-terminale, on retrouve les peptides KEP (bleu), Little (jaune) et Big SAAS (bleu et jaune). En carboxy-terminal, on retrouve les peptides PEN (turquoise) et LEN (orange). Les divers peptides ont été nommés en fonction d'une partie de leur séquence en acides aminés. RR et KR sont les paires d'acides aminés Arginine-Arginine et Lysine-Arginine respectivement, reconnues par les convertases comme site de clivage.

La séquence de proSAAS est retrouvée chez l'humain, la souris et le rat avec un niveau de conservation très élevé surtout dans la région centrale (des acides aminés 65 à 200) (Voir Figure 4). Par contre, proSAAS ne possède pas d'homologie avec des protéines déjà identifiées, mais possède plusieurs similarités avec la famille des granines. Tout comme les granines, proSAAS a une large distribution neuroendocrine (FRICKER et al, 2000). De plus, lorsqu'exprimé dans une cellule possédant la machinerie nécessaire à la sécrétion, proSAAS est sécrété via la voie régulée où il y est

clivé aux paires basiques en plus petits peptides (FRICKER et al, 2000; MZHAVIA et al, 2001; SAYAH et al, 2001). Tout comme la granine 7B2 (LINDBERG et al 1998), proSAAS contient une région riche en proline (PPNPCP) dans la première moitié de la molécule de même qu'une séquence consensus furine de type RXXR à environ 30 à 40 acides aminés du carboxy-terminal (CAMERON et al 2000). De plus, proSAAS est exprimé principalement au cerveau et dans d'autres tissus de type endocriniens et neuroendocriniens (FRICKER et al, 2000) tout comme 7B2 (SEIDEL et al, 1998).

Human	MAGSPLLWGPRAGGVGLLVLLLLGLFRPPPALCARPVKEPRGLSAASPPLAET	53
Rat	MAGSPLLCGPRAGGVGLLVLLLLGLLRPLPTLSARPVKEPRSLSAASAPLAET	53
Mouse	MAGSPLLCGPRAGGVGLLVLLLLGLLRPLPTLSARPVKEPRSLSAASAPLVET	53
	***** ***** ***** * * * ***** ***** **	
Human	GAPRRFRRSVPRGEAAGAVQELARALAHLLAERQERARAEAEQAEEDQQARVL	106
Rat	STPLRLRAVPRGEAAGAVQELARALAHLLAERQERARAEAEQAEEDQQARVL	106
Mouse	STPLRLRAVPRGEAAGAVQELARALAHLLAERQERARAEAEQAEEDQQARVL	106
	* * * ***** ***** *****	
Human	AQLLRVWGAPRNSDPALGLDDDPDAPAAQLARALLRARLDPALAAQLVPAPV	159
Rat	AQLLRWGSPRASDPPLAPDDDPDAPAAQLARALLRARLDPALAAQLVPAPA	159
Mouse	AQLLRWGSPRASDPPLAPDDDPDAPAAQLARALLRARLDPALAAQLVPAPA	159
	***** ** * * * ***** *****	
Human	PAAALRPRPPVYDDGPAGPDAAEAGDETPDVPPELLRYLLGRILAGSADSEGV	212
Rat	PAAALRPRPPVYDDGPTGPDVEDAADETPDVPPELLRYLLGRILTGSSEPEAA	212
Mouse	--AAPRPRPPVYDDGPTGPDVEDAGDETPDVPPELLRYLLGRILTGSSEPEAA	210
	** ***** ***** * * ***** ***** ** *	
Human	AAPRRLRRAADHDVGSSELPPEGVLGALLRVKRIETPAPQVPARRLLPP	260
Rat	PAPRRLRRAVDQDLGPEVPPENVLGALLRVKRIENSSPQAPARRLLPP	260
Mouse	PAPRRLRRSVDQDLGPEVPPENVLGALLRVKRIENSPQAPARRLLPP	258
	***** * * * * ***** ***** ** *****	

Figure 4. Séquences en acides aminés pour proSAAS de rat, souris et humain

Alignement des séquences en acides aminés pour proSAAS humain, de rat et de souris qui démontre une très forte homologie dans la séquence en acides aminés tel qu'indiqué par les astérisques (*). Les flèches présentent les sites de clivage de type SPC. En encadré bleu se trouve la séquence inhibitrice de proSAAS sur SPC3 représentée par les acides aminée LLRVKR.

1.3.4 ProSAAS inhibiteur de convertases

Comme proSAAS démontrait plusieurs similarités avec les granines et plus particulièrement 7B2, le groupe de LD Fricker (FRICKER et al., 2000) s'est penché sur la possibilité qu'il soit un inhibiteur de convertases. Ce groupe a démontré que proSAAS inhibe directement SPC3 et non significativement SPC2 (FRICKER et al., 2000). ProSAAS serait un inhibiteur non-compétitif ou un inhibiteur compétitif fortement lié avec un détachement lent (FRICKER et al, 2000), tandis que d'autres ont déterminé qu'il a une cinétique strictement compétitive sur SPC3 (CAMERON et al, 2000).

Des études antérieures visant à identifier des inhibiteurs de SPC2 et SPC3 en utilisant une librairie de peptides combinatoires avaient permis d'identifier un hexapeptide hautement inhibiteur (3.2 nM) (APLETALINA et al 1998). Ce peptide Ac-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg (LLRVKR) fait partie de la séquence C-terminale de proSAAS et c'est cette même séquence qui aurait une activité inhibitrice sur SPC3 (QIAN et al 2000, CAMERON et al, 2000). Cette activité est retrouvée dans des tests *in vitro*. Une question doit donc se poser à savoir si proSAAS et SPC3 sont retrouvés dans les mêmes tissus, dans les mêmes cellules? Si produit conjointement dans une même cellule en vue d'une production à grande échelle, proSAAS exerce-t-elle toujours une inhibition sur SPC3?

1.4 Objectifs de l'étude

La distribution des diverses convertases a largement été étudiée et a permis de démontrer que chacune d'elles a une expression qui la distingue des autres. La convertase qui nous intéresse plus particulièrement, SPC3, a une distribution endocrine et est retrouvée dans la voie de sécrétion régulée. Comme les granines sont une famille de protéines retrouvées exclusivement au niveau de cette voie de sécrétion et que proSAAS semble faire partie de cette famille par ses caractéristiques, il semblait intéressant d'approfondir sa caractérisation. En effet, puisqu'il est reconnu que proSAAS a une activité inhibitrice sur SPC3 *in vitro*, comme la granine 7B2 sur la convertase SPC2, il s'avérait important de faire une étude de distribution comparative de SPC3 avec proSAAS comme cela avait été fait pour 7B2 et SPC2 (SEIDEL et al, 1998). Il fallait donc vérifier que proSAAS et SPC3 se retrouvaient au niveau des mêmes cellules pour que cette action inhibitrice retrouvée *in vitro* puisse également se retrouver *in vivo*. Cette co-localisation pourrait donc appuyer la possibilité d'une réelle activité inhibitrice de proSAAS sur SPC3 dans un organisme. Le but de l'étude était donc, tout d'abord, d'établir la distribution cellulaire et tissulaire exacte de proSAAS dans divers tissus chez le rat incluant le cerveau, des tissus endocrines telles que l'hypophyse et la surrénale, de même que d'autres tissus n'ayant pas une fonction au premier abord endocrine, soit le petit intestin et les testicules. Ces tissus ayant été choisis à partir d'études préalables démontrant l'expression des ARNm de proSAAS dans ces tissus (FRICKER et al, 2000). Cette distribution permettra ensuite de faire un parallèle entre la localisation de proSAAS et SPC3 dans les mêmes tissus. Pour démontrer la co-

expression de proSAAS et de SPC3 dans les mêmes cellules, les tissus seront soumis à une étude de co-localisation.

L'étude avait pour second objectif de déterminer l'effet régulateur de la co-expression de SPC3 et proSAAS dans un système d'expression de protéines. Lorsque le 21 kDa 7B2 et SPC2 sont co-exprimés, cela permet d'obtenir, après purification, un SPC2 actif contrairement à inactif lorsque exprimé seul (SEIDEL et al, 1998; WESTPHAL et al, 1999). Il était donc important de voir si ce phénomène était également observé dans le cas de SPC3 avec proSAAS. Le but était donc de déterminer si une co-expression SPC3-proSAAS induirait une inhibition de SPC3 ou bien si cette co-expression augmenterait le rendement en activité enzymatique de la protéine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel général

L'ADN complémentaire (ADNc) de proSAAS (rproSAAS/pSPORT1) provient du laboratoire du Dr Lloyd D Fricker (Albert Einstein College of Medicine, New York). Les réactifs de biologie moléculaire comprenant les enzymes de restriction, la ligase, les polymérases (T3, T7 et SP6), la DNase I sans RNase, la RNase A ainsi que la trousse de séquençage T7 DNA polymerase proviennent de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Les isotopes radioactifs (^{33}P -UTP, ^{32}P -UTP, ^{35}S -UTP et ^{35}S -CTP) proviennent de chez Amersham LIFE SCIENCE. Le kit de marquage des sondes non-radioactives à la digoxigénine-11-UTP fut acheté chez Roche Diagnostics (Laval, Québec). Le NBT et le BCIP utilisés pour la détection de l'anticorps anti-Dig-AP a été acquis chez la compagnie Xymotech (Mont-Royal, Québec). La solution d'auto-radiographie NTB-2 et la solution de développement Kodak D-19 proviennent de la compagnie Kodak (Eastman Kodak Company, Verdun, Québec). L'émulsion auto-radiographique Ilford K5D a été achetée chez Ilford (ILFORD Imaging Canada Limited, Markham, Ontario). Le kit d'expression de protéine *Drosophila* expression system (DES), le kit de transfection ainsi que les milieux de culture proviennent de chez Invitrogen (San Diego, CA). Le substrat fluorogénique pERTKR-AMC provient de chez Bachem Bioscience (King of Prussia, PA).

2.2 Hybridation *in situ*

2.2.1 Lames Poly-L-lysine

Des lames de microscope pré-lavées avec un bout givré (Fisher) sont traitées dans un tampon poly-L-lysine (0.01M Tris-HCl pH 8.0 et 50 mg poly-L-lysine hydrobromide pour 1 litre de solution). Deux traitements de 5 minutes dans le tampon entrecoupés d'un séchage de 5 minutes à la température de la pièce sont effectués. Par la suite, les lames sont séchées à 37°C et entreposées à la température ambiante.

2.2.2 Extraction, congélation et coupe de tissus de rat

Les tissus utilisés proviennent de rats Sprague-Dawley sacrifiés par décapitation. Les tissus extraits de l'animal (cerveau, glandes surrénales, hypophyse, iléon, rate, testicules) sont rapidement congelés dans de l'isopentane (4-méthylbutane, Fisher) refroidi à -35°C. Les tissus sont par la suite entreposés à -80°C en vue d'une future coupe. Des coupes de 10µm sont faites à l'aide d'un cryostat (Reichert, Leica Microsystems) dont la température a été préalablement ajustée à -15°C. Les coupes faites à l'aide du cryostat sont immédiatement transférées sur lames traitées à la poly-L-lysine. Par la suite, ces lames sont entreposées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.3 ADN utilisés pour la préparation des ribosondes

L'ADNc de proSAAS chez le rat a été préalablement cloné dans le vecteur pSPORT1 (Gibco BRL) et la ribosonde transcrite à partir de ce vecteur consiste en une séquence de 950 nucléotides correspondant à la région codante entière de proSAAS tel que décrit (FRICKER et al, 2000). Pour l'hybridation *in situ*, des ribosondes sens et anti-sens ont été utilisées. De plus, les sondes d'ARNc de proSAAS ont été employées sous une forme non-radioactive utilisant l'incorporation de la digoxigenin-11-UTP et sous forme radioactive utilisant le marquage au ^{33}P -UTP. Les ribosondes de proSAAS correspondent à une taille de 950 nucléotides. Pour ce qui est des ribosondes anti-sens et sens pour SPC3, elles ont été radio-marquées au ^{35}S -UTP/ ^{35}S -CTP dans les études de double marquage ou au ^{33}P -UTP lors de simple marquage. Ces sondes d'ARNc ont une taille de 590 nucléotides ce qui correspond au segment 1841-2430 de l'ADN de souris pour SPC3 (SEIDAH et al, 1991).

2.2.4 Préparation des ribosondes pour proSAAS et SPC3 de rat

Pour les sondes non radioactives : à 1 μl d'ADN linéarisé (0,5 à 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) proSAAS/pSPORT1/SalI-SP6 (sonde anti-sens) ou proSAAS/pSPORT/NotI-T7 (sonde sens), on ajoute 2 μl de tampon de transcription 10x (400mM Tris pH 7.4, 60mM MgCl_2 , 100mM DTT, 40mM spermidine), 2 μl de mélange pour marquage-NTP (Roche), 1 μl d'inhibiteur de RNase, 2 μl de 100mM DTT, 1 μl d'ARN polymérase et 12 μl d' H_2O -DEPC. On incube ce mélange à 37°C pendant 90 minutes. On ajoute par la suite 5 μl d'ARNt de levure, 4 μl de tampon de transcription 10x, 1 μl d'inhibiteur de RNase, 1 μl

de DNaseI sans RNase puis 29µl d'H₂O-DEPC. Ce mélange est par la suite incubé à 37°C pendant 15 minutes. On ajoute à la réaction 50µl d'H₂O-DEPC puis on procède à une extraction au phénol-chloroforme dans un rapport 1 volume pour 1 volume, suivi d'une précipitation à l'acétate de sodium (1/10 de volume d'acétate de sodium 5M, 2.5 Vol. d'éthanol 100% et 2µl de glycogène). Le culot est ensuite resuspendu dans 100µl de tampon d'hybridation 75% (7.5ml formamide, 1.5ml 20x SSC, 200µl de solution de Denhardt 50X, 400µl d'ARNt de levure, 500µl de tampon sodium-phosphate 1M à pH 7.4).

Pour les sondes radioactives : 25µl de ³⁵S-UTP et 25µl de ³⁵S-CTP ou 62.5µl de ³³P-UTP sont asséchés puis resuspendus dans 4µl d'H₂O-DEPC. On ajoute à cette radioactivité 1µl d'ADN linéarisé (0,5 à 2µg/µl) proSAAS/pSPORT1/SalI-SP6 (sonde proSAAS anti-sens) ou proSAAS/pSPORT/NotI-T7 (sonde proSAAS sens) ou SPC3/pBluescript/EcoRI-T7 (sonde SPC3 anti-sens) ou SPC3/pBluescript/BamHI-T3 (sonde SPC3 sens). Puis successivement, 1µl de tampon de transcription 10x, 1µl de NTP-UTP-CTP (sondes marquées au ³⁵S-UTP/³⁵S-CTP) ou 1µl de NTP-UTP (sondes marquées au ³³P-UTP), 1µl d'inhibiteur de RNase, 1µl de DTT 100mM et 1µl d'ARN polymérase. Une première incubation à 37°C pendant 90 minutes est effectuée suivie d'une autre incubation à 37°C pendant 15 minutes après avoir ajouté à la réaction : 5µl d'ARNt de levure, 4µl de tampon de transcription 10X, 1 µl d'inhibiteur de RNase, 1µl de DNase sans RNase et 29µl d'H₂O-DEPC. Le mélange réactif a ensuite été soumis à une extraction au phénol chloroforme et à une précipitation à l'acétate de sodium.

2.2.5 Hydrolyse de la ribosonde pour proSAAS

Comme les sondes pour proSAAS consistent en sondes de 950 nucléotides, tel que décrit plus haut dans la partie 2.2.4, elles sont trop longues pour la technique d'hybridation *in situ*. Une hydrolyse de la sonde a donc dû être effectuée pour en obtenir une de plus petite taille. Cette technique d'hydrolyse a été décrite précédemment (SCHAFFER & DAY 1994) et consiste en une incubation de la ribosonde dans un tampon carbonate (0.4M NaHCO₃/0.6M Na₂CO₃) à 65°C pendant 15 minutes suivie d'une précipitation à l'éthanol (0.03M d'acétate de sodium pH 5.2, 0.1% d'acide acétique, 0.02mg/ml d'ARN de transfert de levure, 0.2M acétate d'ammonium et éthanol).

2.2.6 Comptage de la radioactivité

Pour l'hybridation *in situ*, la dilution des sondes doit se faire pour obtenir un total de 33×10^3 dpm/ μ l. Pour se faire, 2 μ l de sonde radioactive sont comptés dans un volume de 3ml de liquide à scintillation à l'aide d'un compteur à scintillation. La dilution est ensuite préparée de façon à obtenir le nombre de dpm/ μ l voulu à l'aide du tampon d'hybridation 75%.

2.2.7 Hybridation *in situ*

Les hybridations *in situ* effectuées dans les présentes études ont utilisé des ribosondes sens et anti-sens marquées. Elles ont été combinées de la façon suivante: (1)

dans les études de simple marquage, des sondes d'ARN complémentaire marqués au ^{33}P -UTP (proSAAS ou SPC3) et (2) pour les études de co-localisation (double marquage), un mélange de ribosondes radiomarquées ^{35}S -UTP/ ^{35}S -CTP (SPC3) et non-radiomarquées Dig-UTP (proSAAS).

Les lames à utiliser sont dégelées à l'air pendant 15 à 20 minutes avant de passer aux pré-traitements. Les lames sont mises dans une solution tampon 4% para-formaldéhyde (11.04g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 45.44g de Na_2HPO_4 et 160g para-formaldéhyde dans 4 litres d'eau, pH 7.0-7.4 ajusté avec du NaOH 10N) pendant 60 minutes à la température de la pièce puis lavées 2 fois dans du 1X PBS (81.85g NaCl, 18.45g Na_2HPO_4 et 2.75g NaH_2PO_4 pour 1 litre). Après le lavage au PBS, les lames sont traitées à la protéinase K (0.1µg/ml) dans un tampon Tris-EDTA (100mM Tris et 50 mM EDTA pH 8.0) à 37°C pendant 10 minutes. Les tissus sont ensuite lavés dans de l' H_2O -DEPC pendant 5 minutes puis traitées à la triéthanolamine 0.1M à pH 8.0 pendant 5 minutes. Par la suite, les lames sont acétylées dans du triéthanolamine complétement d'acide acétique anhydre (0.5ml par 200ml de solution triéthanolamine 0.1M pH 8.0). Les lames sont lavées dans du 2x SSC puis déshydratées dans de l'éthanol à concentration croissante (50%→70%→80%→90%→95%→100%→100%) et, finalement, séchées à la température de la pièce et conservées jusqu'à l'application des ribosondes.

Les lames sont subséquemment hybridées avec leurs sondes respectives d'ARNc (1×10^6 cpm/30 µl) diluées dans du tampon d'hybridation pour 16 heures à 55°C. Les lames sont ensuite traitées à la RNase A (40µg/ml) à 37°C pour 45 minutes suivi de

lavages successifs dans du 2x, 1x et 0,5x SSC pour 10 minutes chacun à la température de la pièce. Un dernier lavage de haute affinité est ensuite effectué dans du 0,1x SSC à 60°C pendant 45 minutes. Les lames sont finalement déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (50%→70%→80%→90%→95%→100%→100%) puis asséchées à l'air. Les tissus sont finalement exposés sur un film XAR-5 de Kodak pendant 4 à 6 jours.

2.2.8 Co-localisation de proSAAS et SPC3

Pour les études de co-localisation cellulaire, les coupes de tissus ont été hybridées simultanément avec les sondes marquées à la Dig-UTP (proSAAS) et celles marquées au ^{35}S -UTP/ ^{35}S -CTP (SPC3). La procédure d'hybridation est la même que celle décrite à la section 2.2.7. Au lieu de déshydrater à l'éthanol après le lavage à haute affinité, d'autres étapes doivent être effectuées pour révéler les cellules marquées à la digoxigénine. Après le lavage dans du 0.1X SSC à 60°C, les lames sont transférées dans la solution tampon 1 (100mM TRIS-HCl pH7.5, 150mM NaCl) supplémentée de 0.05% Triton X-100 et 2% de sérum d'agneau à 37°C pendant 2 heures. Les lames sont par la suite lavées dans la solution tampon 1, puis l'anticorps anti-Dig couplé à la phosphatase alcaline dilué 1:1000 dans la solution tampon 1 (contenant 0.3% Triton X-100 et 1% de sérum d'agneau) est appliqué aux lames pour un volume de 150µl chacune. L'incubation avec l'anticorps se fait à la température de la pièce dans une chambre humide pour une durée de 5 heures. Par la suite, les lames sont lavées dans la solution tampon 1 puis transférées dans la solution tampon 2 (100mM Tris pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl_2). La présence de digoxigénine est ensuite révélée à l'aide d'une réaction chromogénique (pour 10ml de solution tampon 2 : 45µl de NBT, 35µl de BCIP et 2.4mg de levamisole).

2.2.9 Immersion dans l'émulsion auto-radiographique

Cette expérimentation va servir à révéler la présence de sondes marquées radioactivement au niveau cellulaire. Toute la technique s'effectue en chambre noire. Cette technique consiste à mettre une émulsion auto-radiographique (NTB2 pour le simple marquage et Ilford K5D pour la co-localisation) sur les lames marquées radioactivement. Les lames sont par la suite séchées à la température de la pièce pendant 2 heures. Elles sont ensuite entreposées à 4°C de 3 jours à 10 semaines pour exposition. Le résultat sur lame est ensuite développé dans du Kodak D-19 pendant 4 minutes et fixé dans du thiosulfate de sodium 30%. Le développement est suivi d'une déshydratation des lames dans des bains d'éthanol à concentration croissante. Pour les études de simple marquage, la déshydratation se poursuit pendant 60 minutes dans un bain d'éthanol à 100%. Les lames sont par la suite colorées dans une solution de coloration au crésyl violet (tampon crésyl: 2g d'acétate de sodium, 3 ml d'acide acétique glacial par litre, 10 ml de crésyl violet 2%) pendant 10 à 15 minutes puis clarifiées dans du xylène. Les lames sont par la suite montées à l'aide de liquide de montage Permount. Dans les études de double marquage, aucune coloration n'est effectuée après le développement puisque les cellules marquées avec la ribosonde proSAAS-Dig sont révélées par une réaction colorimétrique. Elles, sont donc déshydratées dans des bains d'éthanol puis montées à l'aide du liquide de montage Aquaperm (Immunon).

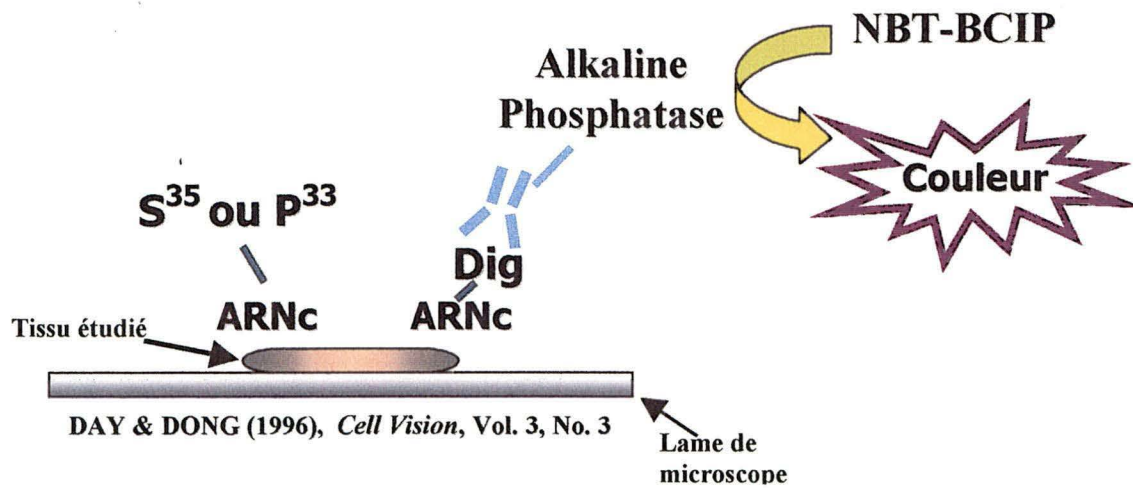


Figure 5. Mode de fonctionnement d'une double hybridation *in situ*

Schématisation des grandes étapes d'une étude de co-localisation sur tissu. Une sonde d'ARNc marqué radioactivement est appliquée sur un tissu simultanément avec une sonde d'ARNc marqué non-radioactivement. La sonde non-radioactive est détectée par une réaction colorimétrique utilisant le NBT et le BCIP comme substrats de la phosphatase alcaline.

2.2.10 Analyse des résultats au microscope

Les résultats obtenus par hybridation *in situ* ont été analysés à l'aide d'un microscope optique Leica muni d'un système de détection auto-radiographique par fibre optique. Ce système envoie de la lumière par les bordures latérales de la lame ce qui permet de visualiser les cellules marquées grâce à l'apparition de grains argents. Les résultats obtenus visualisés au microscope furent numérisés à l'aide d'un appareil photo numérique Kodak DC120. Les photos furent par la suite transférées sur ordinateur et analysées avec le logiciel Adobe Photoshop 5.5.

2.3 Production transitoire de proSAAS et SPC3 dans le système D.E.S.

2.3.1 Clonage de proSAAS dans le vecteur de transfection pAc5.1/V5-His

Pour produire le peptide proSAAS, il faut tout d'abord transférer la séquence codante du gène de proSAAS dans un vecteur d'expression reconnu par les cellules Schneider 2. Le vecteur utilisé dans ce cas est le vecteur pAc5.1/V5-His. Pour introduire l'ADNc de proSAAS, la première étape consiste à l'exciser de son vecteur pSPORT1 (Boehringer). L'ADNc de proSAAS étant retrouvé orienté anti-sens dans ce vecteur, il faut mettre au point une stratégie de restriction permettant d'obtenir un produit final avec une orientation sens. Cette stratégie est obtenue à l'aide des enzymes

de restriction XbaI et EcoRI. Le vecteur pSPORT/proSAAS est donc coupé à l'aide de ces enzymes, de même que le vecteur receveur, soit le pAc5.1/V5-His. Les produits de restrictions sont par la suite mis sur gel d'agarose 1% puis les bandes correspondant à l'insert de proSAAS et le vecteur pAc5.1/V5-His sont coupées et électroéluées. Les deux produits d'élutions furent ensuite soumis à une ligation. Les deux produits sont donc chauffés à 45°C pendant 5 minutes puis la T4 ADN ligase est ajoutée et les produits sont incubés à 16°C pendant 16 heures. Le produit de ligation est par la suite transformé dans des cellules bactériennes *E. coli* compétentes, de type DH5 α , par choc thermique puis mis sur pétri. Le tout est incubé à 37°C pendant 16 à 18 heures.

2.3.2 Extraction d'ADN des clones obtenus par ligation

Des clones obtenus sur pétri, 12 sont réensemencés dans 2 ml de milieu LB auquel de l'ampicilline (100mg/ml) a été ajoutée par mesure de sélection. Ce milieu est ensuite incubé avec agitation pendant 16-18 heures à 37°C. L'ADN est ensuite extrait des bactéries. La première étape consiste à lyser les bactéries dans un mélange de deux solutions (I et II). La solution I permet de re-suspendre, dans 100 μ l, le culot de bactéries obtenu après centrifugation d'un millilitre de milieu de culture. Cette solution consiste en 50mM de glucose, 10mM d'EDTA et 25mM de TRIS-HCl et le tout est ajusté à pH 8.0. La solution II (0.2N de NaOH et 1% SDS) permet la lyse des bactéries avec un volume de 200 μ l. Par la suite, l'ADN est séparé du contenu en protéines par une étape où 200 μ l de chloroforme sont ajoutés. Avant de centrifuger, la solution III (29,4g CH₃COOK et 5ml HCOOC dans 100ml) est ajoutée. Finalement, le surnageant est

précipité à l'éthanol glacial puis l'ADN obtenu est re-suspendu dans 20µl. Un essai de restriction est ensuite effectué pour déterminer les clones positifs.

2.3.3 Séquençage manuel des clones positifs

L'ADN des clones positifs obtenus est ensuite soumis à une dénaturation alcaline pour être ensuite séquençé. Cette étape consiste à mettre l'ADN en présence de NaOH 2N pendant 5 minutes à -20°C. La réaction est ensuite neutralisée avec de l'acétate de sodium 3M à pH 8.0 puis précipité avec de l'éthanol 100%. Le culot obtenu est resuspendu dans 20µl qui vont ensuite être divisés en deux pour avoir 10µl dans chaque tube de façon à pouvoir séquençer anti-sens et sens. Le séquençage est ensuite effectué selon la méthode Sanger-didéoxy avec un marquage de l'ADN avec du S³⁵-dATP à l'aide du kit de la compagnie USB. Les échantillons sont bouillis pendant 5 minutes avant d'être mis sur gel de 12% acrylamide. Après la migration, le gel est transféré sur un papier Whatman 2M et séché à 80°C pendant 1 heure. Le gel est ensuite exposé sur un film Kodak XAR-5 pendant 24 heures. Le film développé est analysé à l'aide d'un logiciel d'alignement de séquence sur Internet au site NCBI. Les clones avec la séquence voulue sont ensuite envoyés à la compagnie Amplicon (Pullman, WA) pour déterminer l'exactitude de chacune des bases de l'ADN puisque l'un des clones est ensuite utilisé pour expression. Le clone exact est ensuite produit en grande quantité dans un système bactérien pour obtenir une grande quantité d'ADN en vue d'une future transfection. L'ADN est extrait grâce au kit WIZARD *Plus* Midiprep (Proméga Corporation, Madison, WI).

2.3.4 Transfection transitoire de SPC3 de souris et proSAAS de rat

Les cellules de *Drosophila* Schneider 2 (S2) sont ensemencées dans un milieu DES complet (milieu complétement de 10% FBS, 2mM de L-glutamine, 50 unités/ml de pénicilline G et 50µg/ml de streptomycine) à une concentration de 1×10^6 cellules/ml et sont cultivées pendant 16 heures à 22-24°C ou jusqu'à l'obtention d'une densité de 2 à 4×10^6 cellules/ml. Les cellules sont par la suite transfectées avec le vecteur mSPC3/pAc5.1/V5-His A ou le vecteur rproSAAS/pAc5.1/V5-His A ou par la combinaison des deux vecteurs pour obtenir une concentration finale de vecteur de 19ng par la méthode au phosphate de calcium décrite par Invitrogen. Cette méthode consiste à incuber l'ADN à transfecter avec du chlorure de calcium et un tampon HEPES-saline (HBS) (50 mM HEPES, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 280 mM NaCl, pH 7.1). Le mélange est incubé pour une période de 45 minutes de façon à permettre la formation du précipité au phosphate de calcium. Ce précipité est ensuite administré aux cellules et incubé pendant 18 heures, puis les cellules sont lavées et cultivées dans le milieu DES complet. Le milieu de culture est collecté après 5 jours d'incubation. Les cellules sont ensuite séparées du milieu de culture et soumises à des extractions d'ARN et des buvardages de type Northern tandis que le milieu de culture sera testé par buvardage de type Western ainsi que par essai enzymatique.

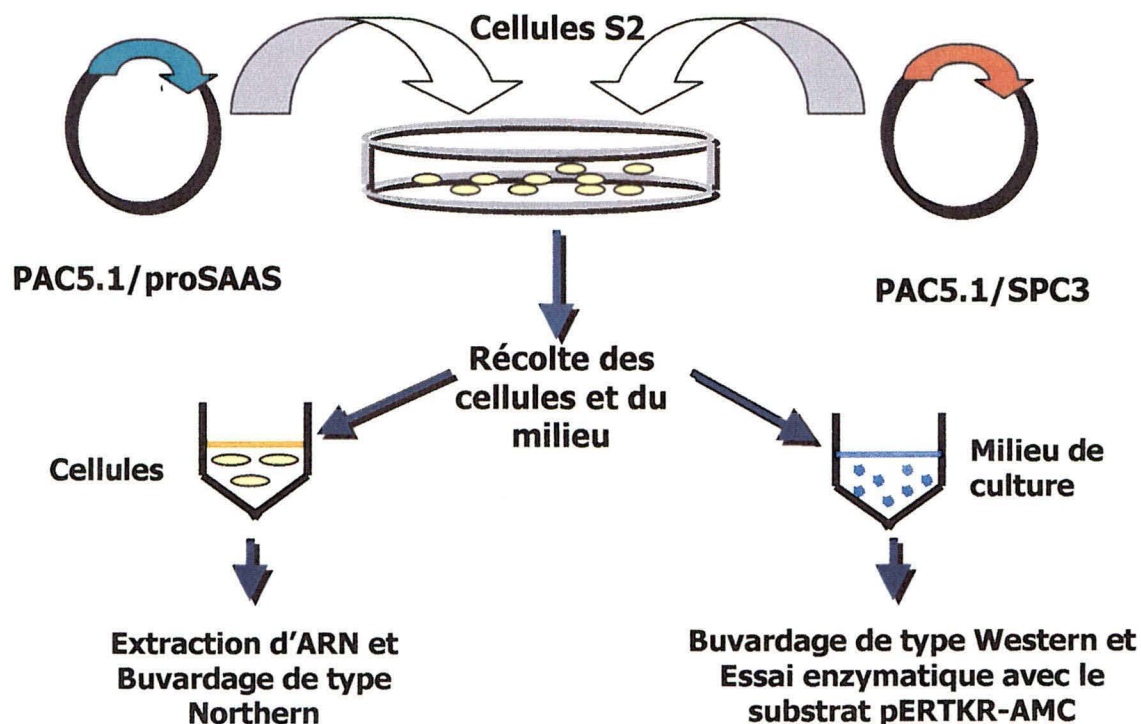


Figure 6. Schéma représentant le fonctionnement d'une transfection transitoire

Représentation schématique du mode de fonctionnement d'une double transfection transitoire dans le système d'expression DES. Les cellules S2 sont transfectées avec le vecteur PAC5.1/proSAAS et le vecteur PAC5.1/SPC3. Après culture, les cellules sont soumises à une extraction d'ARN puis à un buvardage de type Northern et le milieu de culture est soumis à des études de contenu en protéines par buvardage de type Western et à des essais enzymatiques avec le substrat pERTKR-AMC.

2.4 Buvardage de type Northern

2.4.1 Lignées cellulaires

Dans l'étude de localisation de proSAAS, certaines lignées cellulaires furent étudiées dans un but de comparaison. Ce sont des cellules de type endocrines et non-endocrines. Neuro2A (neuroblastome de souris), NG108 (Hybride neuro-blastome-gliome de souris et rat), GH4C1 et GH3 (somatomammotrophes d'hypophyse de rat), AtT-20 (corticotrophes d'hypophyse de rat), Rin m5F (insulinome de rat), BSC-40 (cellules épithéliales de rein de singe vert Africain), PC12 (phéochromocytome de rat), β TC-3 (insulinome de souris), Y-1 (cortex surrénaliens de souris), NIH 3T3 (embryon de souris), Ltk- (tissu conjonctif de souris), TM4 (cellules de Sertoli de souris) et Caco2 (adenocarcinome intestinal humain).

2.4.2 Extraction d'ARN de cellules

Les culots de cellules obtenus après transfection des cellules S2 furent resuspendus dans 300 μ l de tampon GT (5M guanidine isothiocyanate, 10mM EDTA, 50mM Tris pH 7.5 et 8% de mercaptoéthanol). Les cellules ont ensuite été soumises à 3 cycles de gel et dégel (azote liquide et 37°C) puis passées à travers une aiguille 25G1^{1/2} dans une seringue de 1ml. 5-7 Volumes de LiCl 4M ont ensuite été ajoutés aux cellules resuspendues. Le mélange réactif a ensuite été placé sur glace pendant 16 heures à 4°C. Les cellules ont par la suite été centrifugées puis le culot obtenu a été resuspendu dans

du TE/protéinase K (50mM Tris pH 7.5, 5mM EDTA, 0.5% SDS et 150µg/ml de protéinase K) puis incubé à 42°C pendant 3 heures. Une extraction au phénol-chloroforme-isoamyl a été effectuée (1 volume de réactif pour 1 volume de phénol-chloroforme) puis la phase aqueuse a été précipitée à l'éthanol à -20°C pendant 16 heures. Le culot obtenu après précipitation fut resuspendu dans de l'H₂O-DEPC.

2.4.3 Dosage de l'ARN

L'ARN obtenu après l'extraction est dosé par spectrométrie. La densité optique est mesurée à 260 et 280 nm et permettra d'établir un rapport. Ce rapport DO_{260}/DO_{280} (absorbance des acides nucléiques/absorbance des protéines) permettra d'établir le niveau de pureté des échantillons où un rapport de 2 correspond à une solution pure en ARN. Dans le calcul de la concentration des échantillons en ARN, une densité optique à 260nm de 1 unité correspond à une concentration en ARN de 40µg/µl.

2.4.4 Buvarpage de type Northern

Un gel de 1.2% agarose dans 6% formaldéhyde, 20mM HEPES-EDTA, 1mM EDTA pH 7.8 est préparé en vu de la migration des échantillons d'ARN. Les échantillons ont été préparés de façon à avoir 5µg d'ARN auquel on ajoute 10µl de tampon de dilution d'échantillon (1ml HEPES-EDTA, 5ml formamide, 1.6ml 37% formaldéhyde) et 2µl de tampon de chargement (50% glycérol, 0.5% bleu de bromophénol, 0.5% xylène-cyanol). Les échantillons sont chauffés à 65°C pendant 10

minutes puis sont introduits dans les puits du gel pour ensuite poursuivre avec l'électrophorèse dans un tampon de migration contenant 20mM HEPES, 1mM EDTA et 6% formaldéhyde. L'électrophorèse est faite à un voltage de 180 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. Le gel est ensuite rincé dans une solution aqueuse pendant 1 heure puis l'ARN est transféré sur une membrane Nytran N (Xymotech) par capillarité dans une solution de 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M citrate de sodium pH 7.5) pendant 16 heures.

2.4.5 Ribosondes pour la détection d'ARN par buvardage de type Northern

Les ribosondes préparées pour l'hybridation sont préparées par la même méthode que celle employée dans la partie 2.2.4. Seul l'isotope utilisé est différent, soit le P^{32} -UTP. De plus, la sonde préparée pour proSAAS ne nécessite pas l'étape d'hydrolyse. La ribosonde utilisée pour la détection du peptide 7B2 consiste en une sonde qui correspond à la taille complète de l'ADNc de souris soit 1.1 kilobases (MBIKAY et al, 1989).

2.4.6 Hybridation des membranes

La membrane utilisée pour le transfert est séchée à 65°C pendant une heure puis exposée aux UV long pour 45 secondes de façon à fixer l'ARN sur la membrane. Par la suite, la membrane est pré-hybridée dans du tampon d'hybridation (5% SDS, 400mM phosphate de sodium, 1mM EDTA, 1mg/ml BSA, 50% formamide) à 65°C pendant 2

heures avec rotation. La ribosonde est ensuite appliquée à la membrane pour hybridation pendant 18 heures à la même température que pour la pré-hybridation, soit 65°C. Ensuite, la membrane est lavée du signal non-spécifique à l'aide d'un tampon de lavage (0.1% SDS, 0.1 X SSC, 1mM EDTA) pendant 2 heures pour chacun des deux lavages à 70°C. La membrane est par la suite exposée sur un film de type XAR-5 de Kodak pendant 16 heures à -80°C.

2.4.7 Dé-hybridation de la membrane

Comme la membrane utilisée pour la détection de proSAAS et 7B2 dans les cellules dérivées de cellules endocrines et non-endocrines était la même, il a fallut dé-hybrider la membrane pour chaque expérience. Pour ce faire, entre chaque hybridation, la membrane a été lavée de son signal. La membrane est bouillie dans un tampon d'ébullition (0.1% SDS et 1mM EDTA pH 8.0) pendant 15 minutes ou jusqu'à ce que le signal de radioactivité de la sonde utilisée précédemment soit complètement disparu.

2.5 Buvardage de type Western

2.5.1 Buvardage Western du contenu en protéines des milieux de transfection transitoire

Les milieux de culture obtenus après transfection ont été dosés par la méthode Bradford (BRADFORD, 1976) pour établir la concentration en protéines du milieu. La concentration des échantillons a ensuite été ajustée de façon à obtenir une quantité finale de protéines de 20µg. Un volume égal de tampon d'échantillon (Pour 8ml : 3.2ml de SDS 20%, 1.6ml de glycérol, 2mg de bleu de bromophénol, 1.6ml Tris 1.25M pH 6.8, 0.4ml β-mercaptoéthanol, 1.2 ml H₂O) a été ajouté pour chacun des milieux à étudier. Les échantillons sont bouillis pendant 5 minutes puis ils sont soumis à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE de 7.5% à 150 volts, à la température de la pièce jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. Les protéines sont par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham LIFE SCIENCE) activée préalablement dans du méthanol 100%. Le transfert est effectué par électroélution avec un voltage de 100 volts (voltage constant) pendant une heure à 4°C dans un tampon 25 mM Tris, 250 mM glycine, 20% méthanol. La détection de la convertase SPC3 est effectuée avec l'anticorps de lapin dirigé contre la partie amino-terminale de SPC3 de souris (SEIDAH et al, 1991) dilué 1:3000. La détection avec l'anticorps secondaire anti-IgG-HRP de souris (Amersham LIFE SCIENCE) est dilué 1: 1500. La méthode par chemiluminescence avec la trousse ECL + (Amersham LIFE

SCIENCE) a été utilisée pour détecter les anticorps selon les recommandations de la compagnie.

2.5.2 Étude de blocage de SPC3 par buvardage de type Western

Après le dosage en protéines des milieux de culture par Bradford (BRADFORD, 1976), la concentration des échantillons a été ajustée de façon à obtenir une quantité finale de protéines de 20µg. La procédure de séparation des échantillons par électrophorèse a été la même que celle décrite à la partie 2.5.1. Avant la détection de SPC3 par l'anticorps anti-SPC3 N-terminal, celui-ci a été pré-incubé 60 minutes à la température de la pièce avec 5µg de SPC3 purifié (gracieuseté de Claude Lazure, IRCM). La détection de la convertase SPC3 est ensuite effectuée avec l'anticorps de lapin dirigé contre la partie amino-terminale de SPC3 de souris (SEIDAH et al, 1991) dilué 1:3000. Par la suite, l'anticorps secondaire anti-IgG-HRP de souris (Amersham LIFE SCIENCE) dilué 1: 1500 est révélé par la méthode de chemiluminescence utilisant la trousse ECL + (Amersham LIFE SCIENCE) selon les recommandations de la compagnie.

2.6 Dosage de l'activité enzymatique de SPC3 de rat

2.6.1 Essai enzymatique de SPC3 de rat sur les milieux de culture obtenus après transfection des cellules S2

L'activité enzymatique issue des milieux de culture récoltés après transfection des cellules S2 avec de l'ADNc de SPC3 de rat est testée à l'aide d'un substrat fluorogénique spécifique aux convertases. Ce substrat contient un site de reconnaissance des convertases de même qu'une molécule fluorogénique, AMC, qui, lorsque libérée du substrat, émet de la fluorescence. Ce substrat, le pERTKR-AMC, va être clivé par SPC3 en présence d'un tampon Bis-Tris pH 5.7 avec 5mM de CaCl_2 . Le milieu de culture est tout d'abord pré-incubé avec le tampon à 37°C pendant 30 minutes puis le substrat est ajouté à une concentration de 1mM de pERTKR-AMC. La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Spectra Max Gemini XS, Molecular Devices) à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 380 et 460nm respectivement. Les résultats obtenus sont par la suite portés en graphique pour visualiser le potentiel d'inhibition de proSAAS sur SPC3 après co-transfection dans les cellules Schneider 2 (S2).

RÉSULTATS

3.1 Localisation comparative de proSAAS et 7B2 dans des lignées cellulaires

Comme proSAAS a été suggéré comme membre de la famille des protéines de type granine, nous avons décidé d'explorer tout d'abord la distribution de celui-ci en comparaison avec 7B2, lui-même membre des granines. Pour ce faire, nous avons effectué une étude de localisation comparant proSAAS et 7B2 dans un certain nombre de lignées cellulaires dérivées de cellules de types endocriniennes et non-endocriniennes par hybridation de type Northern (Figure 7). Tel qu'il avait déjà été montré dans une étude précédente (SEIDAH et al, 1994), l'ARNm de 7B2 a été retrouvé exclusivement dans des cellules dérivées de cellules endocrines soit Neuro-2A, NG 108, GH4C1, GH3, AtT-20, Rinm5f, PC12 et β TC-3. Par la suite, la même membrane fut ré-hybridée avec une sonde proSAAS après que le signal pour 7B2 eut été complètement lavé. Le résultat obtenu avec proSAAS a démontré une distribution identique à celle observée chez 7B2. C'est-à-dire que proSAAS a été retrouvé exclusivement au niveau de cellules endocrines ou dérivées de cellules endocrines : Neuro-2A, NG 108, GH4C1, GH3, AtT-20, Rinm5f, PC12 et β TC-3. La taille de proSAAS correspond à environ 1.0-1.1 kilobases (kb) comparativement à celle de 7B2 qui possède une taille de 1.2 kb.

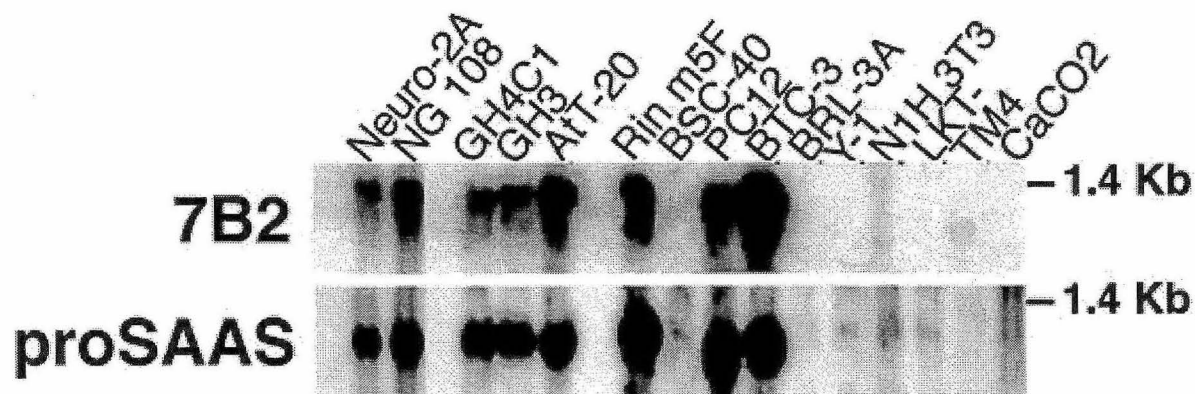


Figure 7. Localisation de proSAAS et 7B2 dans des lignées cellulaires dérivées de cellules endocrines et non-endocrines

Analyse par buvardage de type Northern des ARNm de 7B2 (haut) et proSAAS (bas) dans diverses lignées cellulaires. Dans chaque puit, 5µg d'ARN total ont été chargés et analysés tel que décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Pour la détection des ARNs, le film auto-radiographique a été exposé 3 heures. Les marqueurs de tailles sont montrés à la droite de la figure.

3.2 Localisation de SPC3 et ProSAAS dans le cerveau de rat

Un étude précédente a démontré l'expression de 7B2 dans le système nerveux central de rat et une comparaison avec la distribution de SPC2 (SEIDEL et al, 1998). De façon similaire, nous avons voulu déterminer le patron d'expression des ARNm de proSAAS avec celui de SPC3 (Fig. 8 et 9). Cette étude menée par hybridation *in situ* a été effectuée sur des coupes sériées de tissus portant sur une grande variété de région du cerveau et du cervelet. Il a tout d'abord été démontré que proSAAS est retrouvé dans toutes les régions où on note la présence de neurones et ce, de façon similaire à 7B2. Au contraire, SPC3 a une distribution beaucoup moins importante que proSAAS si l'on compare leur distribution (Fig. 8 et 9). A cette faible résolution, nous avons également pu noter que SPC3 et proSAAS sont souvent retrouvés dans les mêmes régions du cerveau. Par exemple, on retrouve les ARNm de proSAAS et SPC3 au niveau du noyau supraoptique (SO), du noyau para-ventriculaire de l'hypothalamus (PVN) (Figures 9C et D) de même que dans l'hippocampe (Hpc) et le dentate gyrus (DG) (Figure 9G et 9H respectivement). De plus, il apparaît important de noter que la présence d'ARNm de proSAAS est plus fortement marquée que pour SPC3 dans chacune de ces régions si l'on considère que l'exposition des films pour l'autoradiographie de proSAAS a été beaucoup plus courte (1 jour comparativement à 10 pour SPC3) en remarquant que la taille des deux sondes est sensiblement la même. Les expériences contrôles hybridées avec des sondes sens pour proSAAS et SPC3 n'ont démontré aucun signal (Figure 9K et L).

Par la suite, comme le signal pour proSAAS et SPC3 semblait se retrouver dans les mêmes régions du cerveau, nous avons étudié leur distribution à plus forte résolution de façon à pouvoir comparer les types cellulaires marqués. Cette distribution est une fois de plus vérifiée sur des lames consécutives puisque les tissus retrouvés dans la Figure 9 sont ensuite enrobés dans une émulsion auto-radiographique. On retrouve des exemples représentatifs à la Figure 10. Cette expérience nous a permis de déterminer que la présence de proSAAS, tout comme SPC3, est uniquement retrouvée au niveau neuronal grâce au type de coloration utilisé, le crésyl violet.

Comme le démontre la Figure 10, il est possible d'établir une forte corrélation entre proSAAS et SPC3. En fait, le signal pour proSAAS et SPC3 est très semblable au niveau des cellules marquées dans le PVN (Fig. 10A et 10B) et dans l'hippocampe (Fig. 10C et 10D). Cela suggère la possibilité pour proSAAS et SPC3 d'être co-exprimés dans une même cellule.

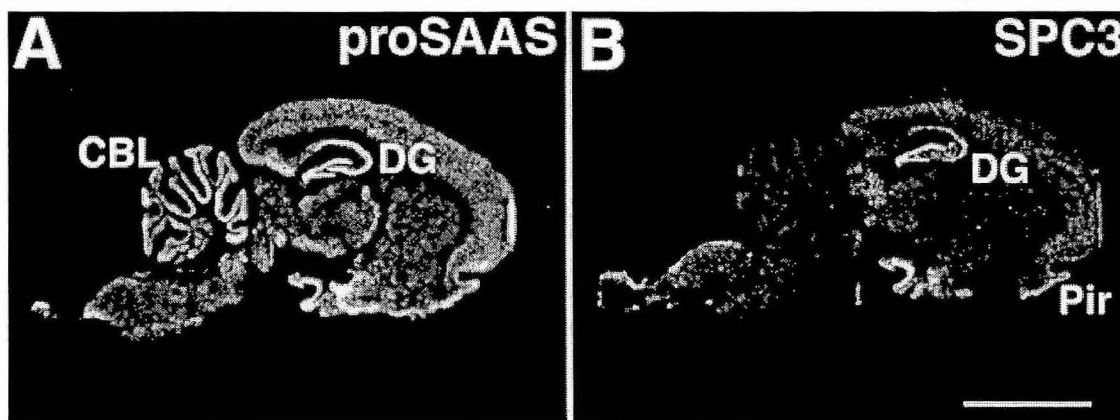


Figure 8. Distribution de proSAAS et SPC3 dans le cerveau de rat (coupe sagittale)
Distribution de (A) proSAAS et (B) SPC3 dans des coupes sagittales de cerveau de rat. L'expression de SPC3 apparaît concorder avec celle de proSAAS. Abréviations : CBL, cervelet; DG, dentate gyrus; Pir, cortex piriforme. Bar=6mm.

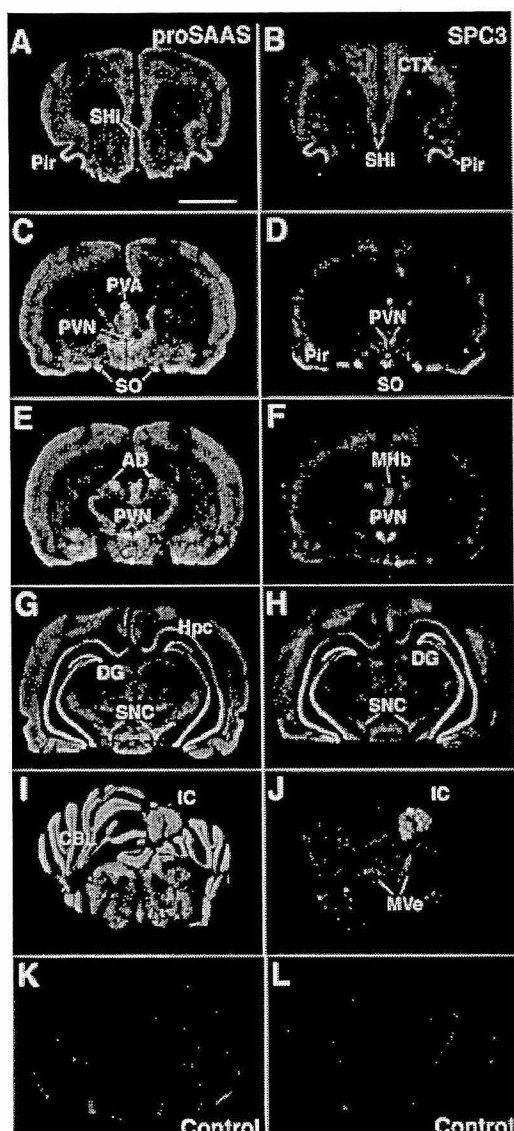


Figure 9. Localisation dans le cerveau de rat de SPC3 et proSAAS (coupes transversales)

Images auto-radiographiques de sections transversales consécutives de cerveau détectant les ARNm de proSAAS (A,C,E,G,I) et SPC3 (B,D,F,H,J). Le patron d'expression de SPC3 démontre une fois de plus un chevauchement avec celui de proSAAS. Aucun marquage n'est observé pour les sondes sens de proSAAS et SPC3 (K et L respectivement). Abréviations :AD, noyau thalamique antérodorsal; CTX, cortex cérébral; Hpc, hippocampe; IC, colliculus inférieur; MHb, noyau habénulaire médian; MVe, noyau vestibulaire médian; PVN, noyau paraventriculaire hypothalamique; SHi, noyau septohippocampal, SNC, substance noire; SO, noyau supraoptique. Bar=4mm.

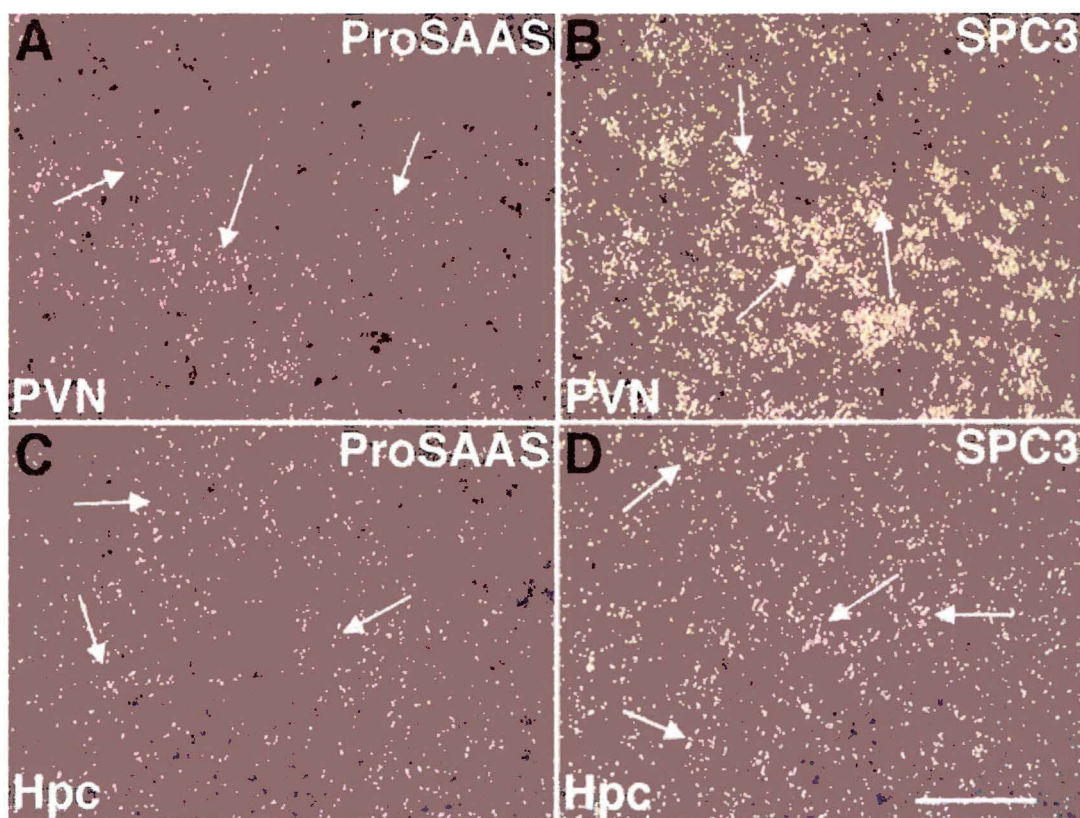


Figure 10. Localisation comparative de proSAAS et SPC3 au SNC

Sections adjacentes montrant l'expression de proSAAS (A,C) et SPC3 (B,D) dans le noyau paraventriculaire (PVN) et dans l'hippocampe (Hpc). Les sections ont été soumises à une immersion dans de l'émulsion auto-radiographique dans le but d'obtenir des images à une résolution cellulaire. Les flèches montrent des exemples de neurones marqués. Les neurones ont été identifiés à l'aide de la coloration au crésyl violet. Bar=0.5µm.

3.3 Co-localisation cellulaire de SPC3 et ProSAAS au niveau du cerveau

Puisque les études de simple localisation ont permis de déterminer que les ARNm de proSAAS et SPC3 semblaient être retrouvés dans les mêmes régions et les mêmes types cellulaires, nous avons voulu pousser plus loin et déterminer si ces deux ARNm étaient co-localisés. Pour obtenir plus d'information concernant l'expression concomitante de proSAAS et SPC3, nous avons donc effectué des expériences de double marquage sur un même tissu en utilisant une sonde marquée non-radioactivement pour l'ARNc de proSAAS et une sonde radioactive pour celui de SPC3. À la Figure 11, nous retrouvons des résultats montrant, grâce à la co-localisation, la présence des ARNm de proSAAS et SPC3 au niveau des cellules de Purkinje (Fig. 11A) et du noyau supraoptique (Fig. 11B). Par cette étude, nous avons également pu identifier plusieurs cellules exprimant l'ARNm de proSAAS sans la présence de SPC3, comme au niveau du noyau pontine (Fig. 11C). Par contre, aucune cellule dénotant la présence des ARNm de SPC3 n'a pu être identifiée sans la présence de ceux de proSAAS. Le signal de localisation de SPC3 est donc toujours co-localisé avec celui de proSAAS.

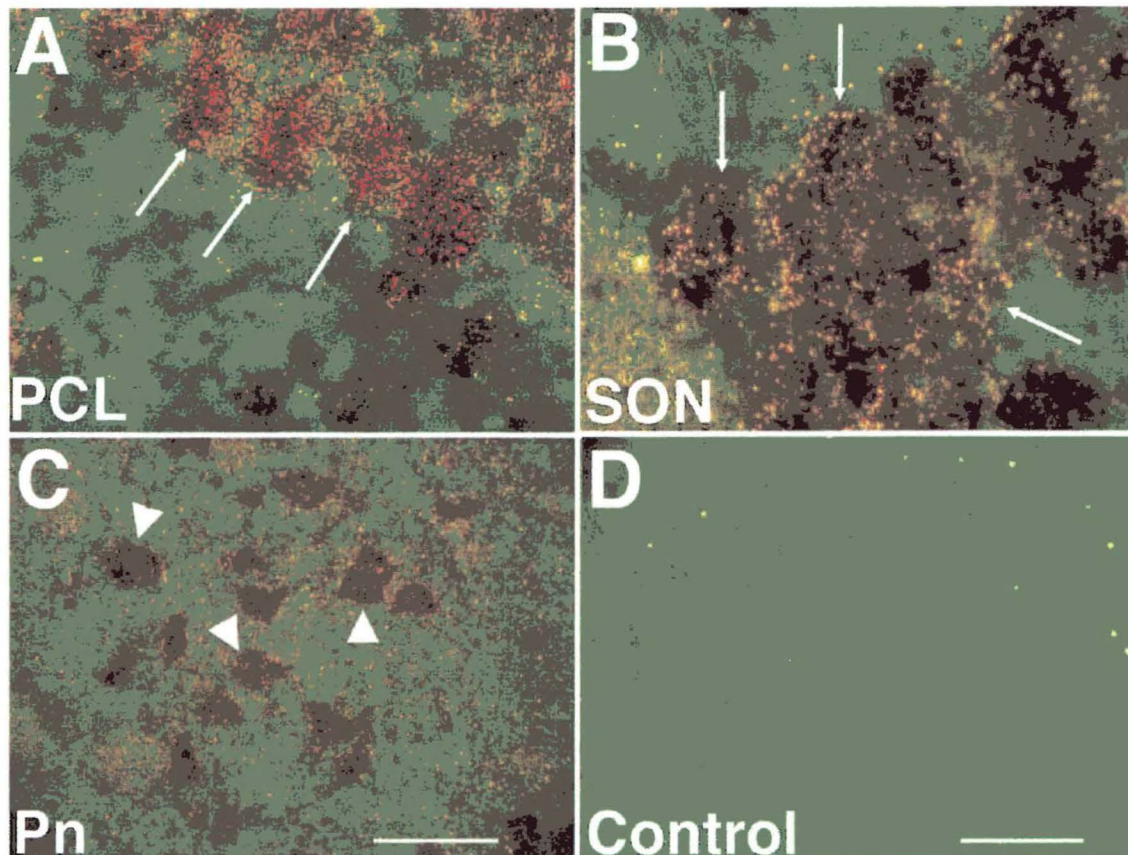


Figure 11. Co-localisation de proSAAS et SPC3 chez le rat au niveau du cerveau

Études de co-localisation des ARNm de proSAAS et SPC3 au niveau du cerveau dans (A) les cellules de Purkinje (PCL); (B) le noyau supraoptique (SON); (C) le noyau pontine (Pn). (A) et (B) montrent des exemples de co-localisation de proSAAS et SPC3. ProSAAS est détecté par une sonde non-radioactive visible par une coloration brun-violet. SPC3 est décelé par une sonde radioactive résultant en grains d'argent. Les petites flèches pointent la co-localisation entre proSAAS et SPC3. En (C), un exemple de cellules qui expriment proSAAS, mais non SPC3. Les têtes de flèches indiquent des cellules avec une coloration brun-violet intense, mais aucun grain d'argent. La fenêtre (D) correspond à une image contrôle avec une sonde sens proSAAS marquée à la Dig. Bar : A,B,C=25nm et D=0,5µm.

3.4 Localisation de ProSAAS et SPC3 dans divers tissus périphériques

Puisqu'il est apparu évident que SPC3 et proSAAS avaient une distribution similaire dans le système nerveux central, il était intéressant de déterminer leur présence dans des tissus périphériques au niveau de certaines cellules endocrines. Il était, par le fait même, important d'étudier la possibilité de co-expression dans ces tissus périphériques. Les divers tissus étudiés ont été choisis d'après des études par buvardage de type Northern qui ont démontré que ces tissus semblent exprimer les ARNm de proSAAS (FRICKER et al, 2000). Utilisant toujours la technique d'hybridation *in situ*, nous avons observé la présence de proSAAS au niveau de l'hypophyse (Fig. 12A) et de la glande surrénale (Fig 12C). Au niveau de l'hypophyse, proSAAS est fortement retrouvé au niveau du lobe antérieur et du lobe intermédiaire. L'expression de SPC3 a été également retrouvée dans les régions antérieures et intermédiaires de l'hypophyse (Fig. 12B). Par contre, le niveau d'expression de l'ARNm de proSAAS dans le lobe antérieur est beaucoup plus prononcé que pour SPC3 si l'on considère une fois de plus le temps d'exposition beaucoup plus grand pour SPC3. Comme le lobe intermédiaire est, de façon homogène, constitué de mélanotrophes, nous pouvons établir que SPC3 et proSAAS sont co-localisés dans ce type cellulaire. En ce qui a trait à la surrénale, proSAAS (Fig. 12C) et SPC3 (Fig. 12D) sont retrouvés au niveau de la médullo-surrénale et vraisemblablement dans les cellules chromaffines. Il serait intéressant de noter également la présence de proSAAS sur la couche extérieure du cortex de la surrénale qui constitue la couche gloméruleuse, responsable pour la synthèse

d'aldostérone. Nous avons également étudié l'expression de SPC3 et proSAAS dans les testicules et observé que SPC3 n'est pas exprimé dans ce tissu. Par contre, nous avons déterminé la présence de proSAAS dans le testicule (Fig. 12E), soit plus précisément au niveau de cellules interstitielles (Fig. 12F). Ce type cellulaire marqué correspond probablement aux cellules de Leydig. Finalement, un dernier tissu fut étudié, le petit intestin et plus précisément l'iléon. À faible grossissement, il est apparu évident que proSAAS avait un fort signal en périphérie (Fig. 13A). L'expression de SPC3 semblait quant à elle beaucoup plus se retrouver à l'intérieur du tissu, ce qui correspond à l'intérieur de l'épithélium intestinal (Fig. 13B). Par contre, il était de mise d'aller vérifier au niveau cellulaire quels types de cellule avaient du marquage, puisque, jusqu'à maintenant, aucune cellule exprimant du SPC3 n'exprimait pas proSAAS.

À fort grossissement, nous avons constaté que l'ARNm de proSAAS est retrouvé au niveau de cellules ganglionnaires situées entre deux couches de muscles lisses entourant l'épithélium intestinal (Figure 13C). Quant à l'ARNm de SPC3, il a été retrouvé dans des cellules ganglionnaires au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 13D). Fait important à noter, les cellules ganglionnaires qui expriment du SPC3 n'expriment pas l'ARNm de proSAAS. L'iléon est donc le seul tissu ou organe parmi ceux étudiés où l'expression de proSAAS ne corrèle pas avec celle de SPC3.

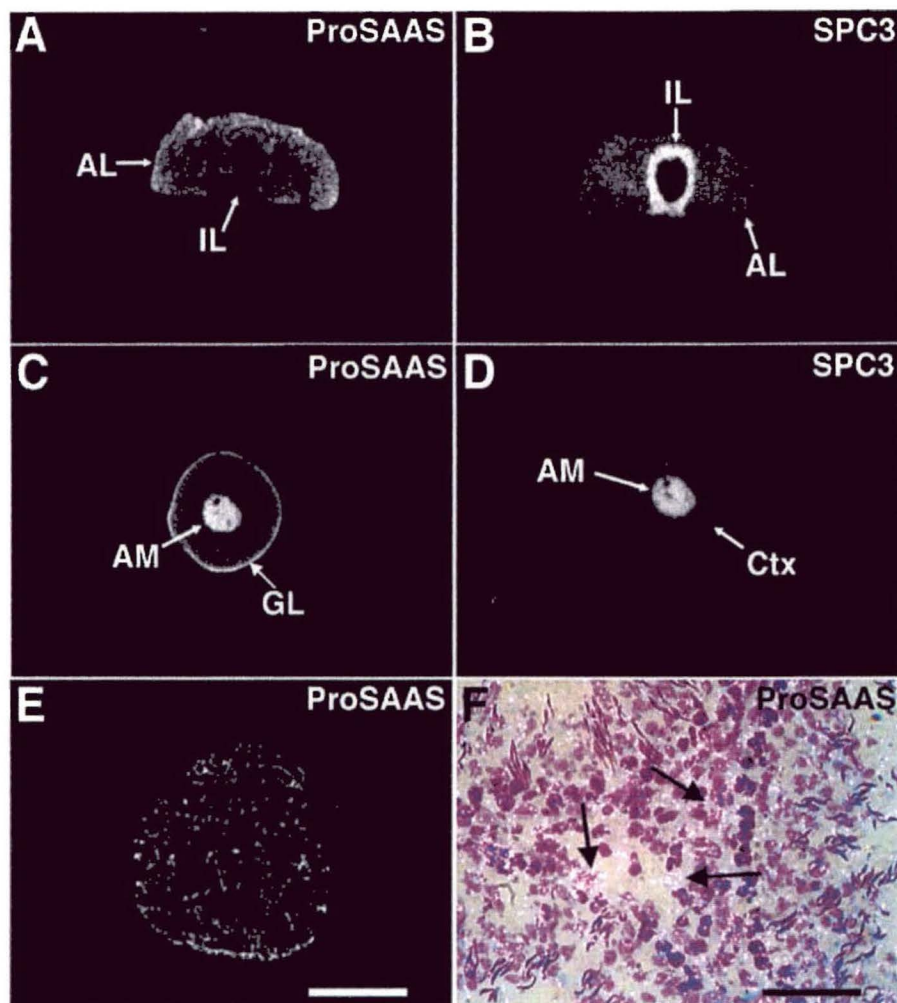


Figure 12. ProSAAS et SPC3 dans divers tissus périphériques endocrines

Distribution de proSAAS et SPC3 dans des sections consécutives de tissus de rat incluant l'hypophyse (A,B), la glande surrénale (C,D) et (E,F) les testicules. Au niveau de l'hypophyse, les deux ARNm sont retrouvés au niveau du lobe antérieur (AL) et du lobe intermédiaire (IL). ProSAAS et SPC3 sont observés dans la médullo-surrénale (AM). De plus, proSAAS est également observé dans la couche gloméruleuse (GL) qui est représentée par la couche marquée en blanc en bordure de la surrénale (C). En (E), une image auto-radiographique en fond noir permet de visualiser l'ARNm de proSAAS dans les testicules. Les sections traitées avec l'émulsion auto-radiographique et colorées au crésyl violet révèlent un marquage au niveau des cellules interstitielles, probablement les cellules de Leydig tel que pointé par les flèches noires (F). Bar A,B,C,D,E, 3mm; F, 0.3µm

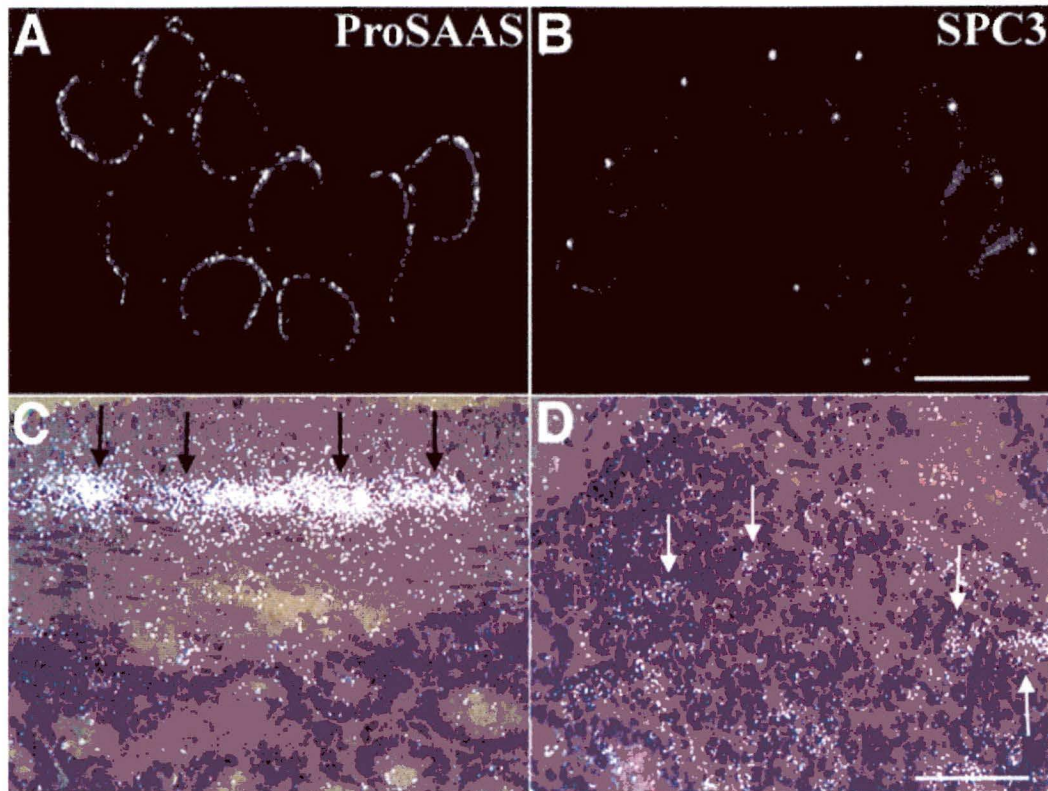


Figure 13. Position distincte de proSAAS et SPC3 dans l'iléon de rat

Expression des ARNm de (A,C) ProSAAS et (C,D) SPC3 dans l'intestin de rat en coupes transversales. (A,B) présentent les images en faible résolution obtenues par film auto-radiographique démontrant un marquage intense pour proSAAS et SPC3 dans des régions différentes. En (C) et (D), le même tissu soumis à l'émulsion auto-radiographique puis observé au microscope a révélé que proSAAS (C) est exprimé dans le muscle au niveau de cellules ganglionnaires (flèches noires) entourant l'intestin et SPC3 est exprimé dans l'épithélium intestinal (flèches blanches) au niveau de cellules endocrines. Bar : A et B : 5mm; C et D : 0.3 μ m

3.5 Transfection de proSAAS et SPC3 dans le système DES

Comme il était connu que proSAAS exerçait une inhibition sur SPC3, nous avons voulu étudier l'interaction des deux protéines après leur production dans un système d'expression à grande échelle. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules de *Drosophila* Schneider 2 (S2) avec le vecteur codant pour proSAAS et avec celui codant pour SPC3. Par la suite, diverses études ont été faites sur les cellules transfectées et sur le milieu de culture dans lequel on retrouve du SPC3 et du proSAAS.

3.5.1 Northern pour proSAAS et SPC3

Dans le but de déterminer si les cellules transfectées avec les vecteurs codant pour proSAAS et SPC3 étaient en mesure d'exprimer l'ARNm de ces enzymes et protéines, nous avons fait un buvardage de type Northern. Le buvardage a été fait après avoir extrait l'ARN des cellules pour chacune des transfections effectuées. Le buvardage utilisant une sonde d'ARNc de proSAAS a reconnu chacun des puits correspondant à des cellules où du proSAAS a été transfecté, soit les puits 2 et 3 (Figure 14A haut). Ceci permet de croire que la transfection a fonctionné pour proSAAS. Les différentes cellules expriment approximativement la même quantité d'ARNm pour proSAAS après vérification par la normalisation du résultat à l'aide du contrôle ribosomal 18S bovin (Figure 14A bas). Le même résultat fut observé dans le cas de SPC3 où de l'ARNm codant pour SPC3 est visualisable dans les puits 1 et 3 (Figure 14B haut). Après normalisation avec le contrôle ribosomal 18S bovin, il y a la même quantité d'ARNm

pour SPC3 dans les deux transfections. De plus, dans les cellules co-transfectées avec SPC3 et proSAAS, les deux ARNm semblent être exprimés à une même concentration.

3.5.2 Buvarpage de type Western du contenu en protéines sécrétées dans les milieux de culture des cellules S2 transfectées

Comme les ARNm de proSAAS et SPC3 étaient bien exprimés dans les cellules S2 après transfection, il semblait important de déterminer si ces cellules avaient la capacité d'exprimer l'enzyme SPC3 et le peptide proSAAS et de l'excréter dans le milieu de culture. Comme les milieux de culture seraient soumis à des essais enzymatiques, cette étape constituait la plaque tournante de l'expérience. Les milieux de culture obtenus après transfection des cellules S2 furent récoltés après 5 jours d'incubation par centrifugation pour séparer le milieu de culture des cellules. Les milieux de culture prélevés ont été vérifiés par buvardage de type Western pour détecter soit l'enzyme SPC3 ou le peptide proSAAS. En ce qui a trait à SPC3, celui-ci fut retrouvé sous ses deux formes de 66 et 87 kDa et exprimé en quantité égale pour le milieu de transfection produisant SPC3 seul lorsque comparé avec le milieu exprimant SPC3 et proSAAS ensemble (Figure 15). Par contre, dans le cas du proSAAS, l'anticorps utilisé pour détecter ce peptide s'est avéré inefficace (non-présenté). Ainsi, seuls les résultats obtenus à l'aide de l'anticorps anti-SPC3 furent confirmés. Comme les cellules exprimaient l'ARNm de proSAAS, nous croyons que les cellules devaient également exprimer le peptide dans le milieu de culture comme c'est le cas pour SPC3.

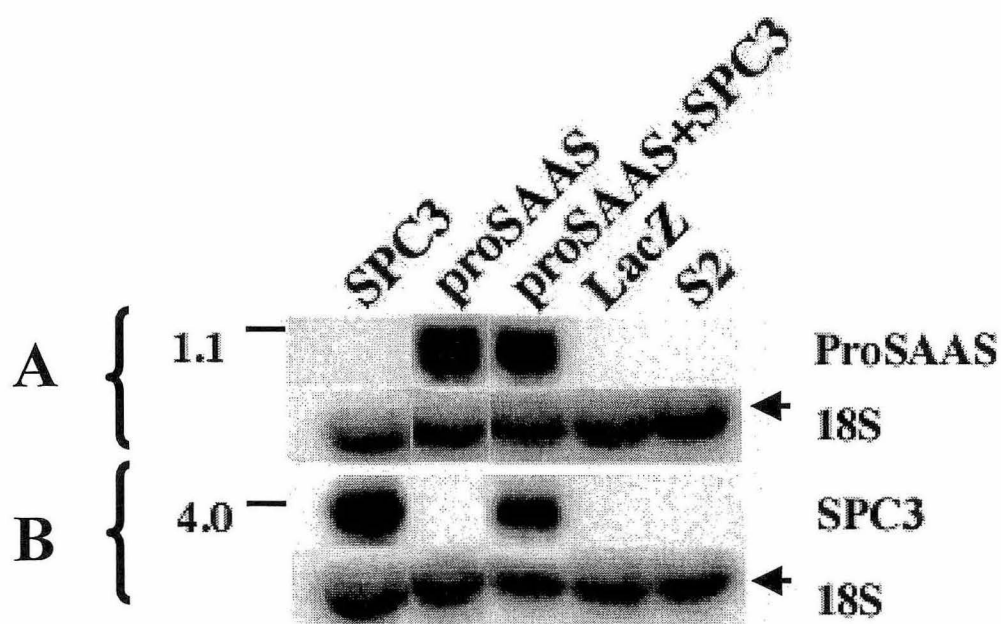


Figure 14. Buvardage de type Northern représentant la présence des ARNm de proSAAS et SPC3 après transfection des cellules S2

Buvardage de type Northern des ARNs extraits des cellules S2 après transfection. Chaque puit correspond à une transfection précise où 5 μ g d'ARN total a été chargé. Les ARNm de proSAAS (A) et SPC3 (B) ont été détectés à l'aide de sondes d'ARNc dirigées contre proSAAS (A) et SPC3 (B). Les ARNm de proSAAS et SPC3 ont été décelés respectivement à des tailles d'environ 1.1kb et 4.0kb. Le contrôle interne ribosomal 18S bovin a été utilisé pour normaliser les buvardages Northern pour proSAAS (A bas) et SPC3 (B bas)

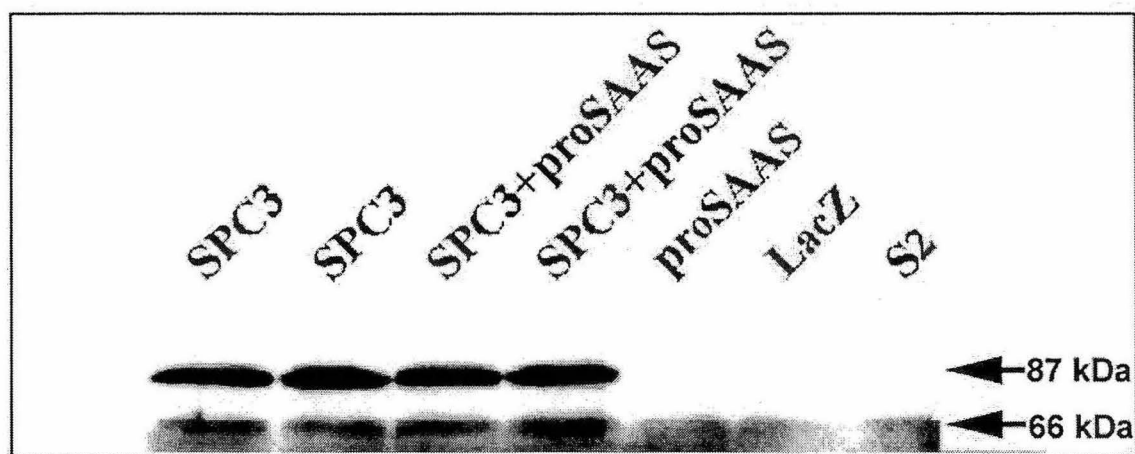


Figure 15. Buvarbage de type Western de milieu de culture de cellules S2 avec l'anticorps anti-SPC3

Buvarbage de type Western où l'enzyme SPC3 est détectée avec l'anticorps de lapin dirigé contre la partie amino-terminale de SPC3. Dans chaque puit, 20µg de protéines prises dans les milieux de culture bruts ont été chargées. Dans les divers puits, on retrouve les différentes transfections étudiées dont celles où les cellules S2 ont été transfectées avec SPC3. Celles-ci sont présentées en duplicata. Après détection à l'aide de l'anticorps anti-SPC3 N-terminal, SPC3 (flèches) est retrouvé sous ses deux formes attendues de 87 et 66 kDa dans les puits SPC3 et SPC3+ proSAAS. Les trois derniers puits correspondent à des contrôles négatifs de SPC3 soit proSAAS, LacZ et S2.

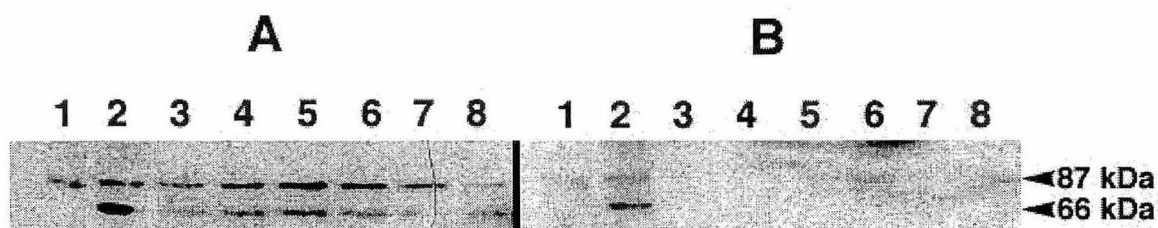


Figure 16. Buvarpage de type Western de milieux de culture de cellules S2 avec ou sans blocage de l'anticorps anti-SPC3 de souris

Buvarpage de type Western où l'enzyme SPC3 est détectée avec l'anticorps de lapin dirigé contre la partie amino-terminale de SPC3. Dans chaque puit, 20 μ g de protéines issues de milieux de culture bruts ont été chargées. Les puits 1 à 8 correspondent au contenu du milieu de culture de diverses transfections de cellules S2 avec du SPC3. On retrouve le résultat de détection de SPC3 par l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale (A) et la détection de SPC3 après le blocage de l'anticorps anti-SPC3 par environ 5 μ g de SPC3 purifiées (B). Les bandes, correspondant à SPC3 (66kDa et 87 kDa), obtenues en A sont disparues après le blocage de l'anticorps.

3.5.3 Étude de blocage de l'anticorps anti-SPC3 avec de l'enzyme SPC3 purifiée

Afin de déterminer la spécificité de l'anticorps anti-SPC3, une étude de blocage a été effectuée. Cette étude, comparant une hybridation sans blocage de l'anticorps (Figure 16A) et une hybridation avec blocage au préalable de l'anticorps (Figure 16B), a permis de mettre en évidence la spécificité de l'anticorps anti-SPC3 N-terminal. La présence des bandes de 87kDa et 66kDa sur les puits 1 à 8 de la figure 16A permet d'affirmer que les milieux de culture 1 à 8, issus de transfections transitoires de SPC3 dans les cellules S2, sont enrichis en SPC3. La figure 16B confirme que l'anticorps anti-SPC3 N-terminal est spécifique à SPC3 puisque l'anticorps, qui a été préalablement incubé avec de l'enzyme SPC3 purifiée (Claude Lazure, IRCM), ne détecte plus les bandes de SPC3, autant la forme 87 kDa que la forme 66 kDa, car il est complexé à l'enzyme en solution.

3.5.4 Essais enzymatiques sur les milieux de culture des cellules S2 transfectées

Il était désormais connu que les cellules transfectées avec SPC3 et proSAAS exprimaient la protéine SPC3. De façon probable, ces cellules exprimaient également le peptide proSAAS, puisque l'ARNm de celui-ci était transcrit, il s'avérait donc important de voir l'effet que proSAAS aurait sur SPC3. Tel que démontré par des études antérieures, proSAAS devrait avoir une action inhibitrice sur SPC3. Les résultats présentés par le graphique à la figure 17 représentent les pourcentages d'activité enzymatique relative à celle mesurée dans le milieu de culture S2, que l'on considère

comme 100% sur le substrat fluorogénique spécifique aux convertases, le pERTKR-AMC. Le milieu S2 est un milieu de culture conditionné, puisque les cellules n'ont pas été transfectées avec un vecteur. Ce milieu de culture présente donc l'activité enzymatique d'enzymes sécrétées par ces cellules à l'état sauvage, ce que l'on considère ici comme le bruit de fond. Dans les cellules transfectées avec un vecteur portant le gène codant pour Lac Z (Figure 17, colonne rose), aucune activité dans le milieu autre que le bruit de fond n'est observée, de même que dans le milieu issu des cellules transfectées avec proSAAS seulement (Figure 17, colonne jaune). Les pourcentages de ces deux milieux de culture (114% et 94% respectivement) avoisinent celui du milieu S2 qui est de 100% tel qu'attendu. Dans la colonne suivante (Figure 17, bleu pâle), on retrouve l'activité enzymatique de SPC3 vis-à-vis de son substrat pERTKR-AMC. Le pourcentage relatif d'unités de fluorescence obtenues pour SPC3, qui est de 207%, démontre que SPC3 coupe le substrat et libère l'AMC mesurable par une augmentation de fluorescence par rapport au bruit de fond retrouvé dans les milieux S2, LacZ et proSAAS. Par contre, après avoir soumis le milieu de culture de la co-transfection des cellules S2 avec SPC3 et proSAAS au substrat fluorogénique, aucune inhibition d'activité de proSAAS sur SPC3 ne fut observée (Figure 17, colonne lilas). En fait, si l'on compare le pourcentage d'unités de fluorescence libérées par les enzymes du milieu SPC3 seul avec celui où SPC3 et proSAAS sont co-exprimés sur le substrat pERTKR-AMC, l'activité enzymatique observée est relativement la même, soit 207% pour SPC3 comparativement à 200% pour le milieu avec proSAAS et SPC3. ProSAAS ne semble pas inhiber SPC3 lorsqu'ils sont retrouvés conjointement dans le milieu de culture.

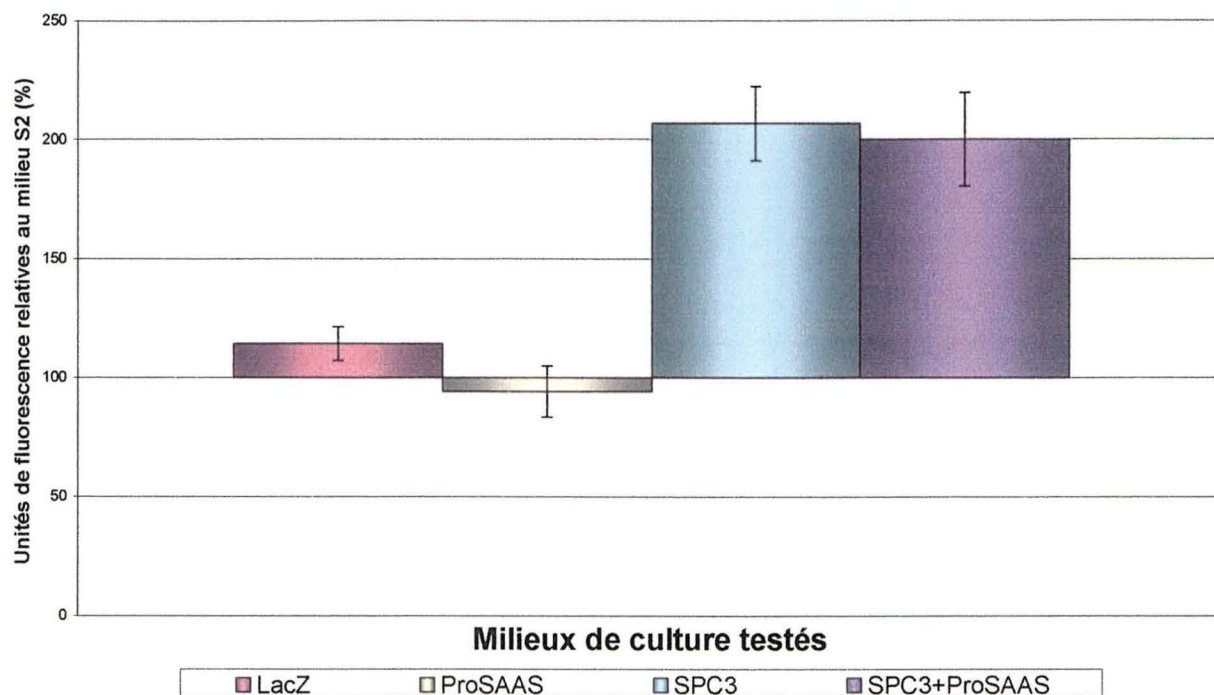


Figure 17. Représentation de l'activité enzymatique relative de type convertase dans les divers milieux de culture bruts après transfection transitoire des cellules S2

Graphique représentant les divers niveaux d'activité enzymatique de type convertase dans les différents milieux de culture bruts de cellules S2 transfectées. Résultats présentés en pourcentage où le milieu S2 représente 100%. Pour chaque essai, 10µl de milieu de culture ont été incubés pendant 60 minutes avec le substrat pERTKR-AMC spécifique aux convertases dans un tampon Bis-Tris pH 5.7 avec 5mM de CaCl₂. Les milieux LacZ et proSAAS sont des milieux contrôles négatifs où l'activité convertase représente le bruit de fond produit par des enzymes endogènes sécrétées par les cellules S2. Ce graphique représente la moyenne de 5 essais ± erreur standard.

DISCUSSION

Tel que décrit plus tôt dans l'introduction, les granines forment un groupe de protéines où les caractéristiques physiologiques sont peu définies. Ce groupe inclut les chromogranines A, B, la sécrétogranine II et 7B2 (HUTTNER et al 1991; OZAWA & TAKATA 1995) et possiblement proSAAS. Une première caractéristique importante des membres de ce groupe constitue leur patron d'expression très strict au niveau de tissus et cellules neuronales et endocrines, mais leur fonction n'y est pas encore très bien définie. Plusieurs études ont suggéré que la chromogranine A, la chromogranine B et la sécrétogranine II pourraient être précurseurs de peptides bioactifs (NATORI & HUTTNER 1994), mais également impliqués dans le triage de protéines au niveau de la voie de sécrétion régulée (BAUERFEIND & HUTTNER 1993; OZAWA & TAKATA 1995). Le cas de 7B2 semble le mieux défini de tous puisqu'il a été reconnu que celui-ci possède une double activité sur la convertase SPC2 car il dispose d'une fonction inhibitrice et activatrice sur celle-ci (BRAKS & MARTENS 1994, MARTENS et al, 1994; ZHU & LINDBERG 1995). Le nouveau précurseur de type granine, proSAAS semble posséder certaines caractéristiques semblables à celles de 7B2 puisqu'il possède une activité inhibitrice sur la convertase SPC3. Comme il existe un parallèle au point de vue de la fonction entre ces deux précurseurs au niveau de la voie de sécrétion régulée, cela nous a poussé à investiguer sur la distribution de proSAAS en relation avec celle de SPC3 dans diverses régions du système nerveux central de même que dans divers tissus à vocation endocrine et non-endocrine.

Notre présente étude a démontré que, comme 7B2 (SEIDEL et al, 1998), proSAAS a une distribution très large au niveau du système nerveux central. Cette distribution est exclusive aux neurones et est considérée pan-neuronale. De plus, l'expression de proSAAS a été observée uniquement au niveau de cellules dérivées de cellules endocrines exprimant également 7B2. Cette très grande corrélation d'expression au niveau du SNC et dans les lignées cellulaires porte à croire que l'expression de proSAAS est fortement liée à la présence de la voie de sécrétion régulée, de manière semblable à 7B2. Même si aucune homologie de séquence en acides aminés peut être observée, l'expression très restreinte de proSAAS aux cellules neuro-endocrines et endocrines permet de catégoriser ce dernier comme précurseur de type granine (FRICKER et al., 2000).

Du point de vue de la fonction de proSAAS, plusieurs études précédentes ont démontré son activité inhibitrice sur SPC3 (FRICKER et al, 2000; QIAN et al, 2000; CAMERON et al, 2000). La séquence inhibitrice potentielle a été cartographiée pour être localisée dans la partie C-terminale du précurseur et est composée des acides aminés LLRVKR (FRICKER et al, 2000; CAMERON et al, 2000). Il a été démontré que ce peptide a un très fort potentiel inhibiteur (i.e. nM) spécifique à SPC3. Au sens strict, un inhibiteur ne co-existe pas nécessairement avec l'enzyme. Ce que nous voulions démontrer par la co-habitation était la possibilité pour proSAAS d'être inhibiteur de SPC3 dans la cellule où ils sont produits. Puisqu'aucune donnée ne soutient la sécrétion du peptide inhibiteur de proSAAS des cellules où il est produit, l'interaction avec SPC3 dans la cellule même où il est produit restait l'option la plus probable. Pour supporter cette notion *in vivo*, il fallait déterminer si SPC3 et proSAAS étaient co-localisés tout

comme le sont 7B2 et SPC2 (SEIDEL et al, 1998). Nos études ont démontré qu'au niveau du système nerveux central, les neurones exprimant SPC3 co-expriment toujours proSAAS. De façon similaire, au niveau des tissus périphériques endocrines, l'hypophyse intermédiaire et la médullosurrénale, principalement, la distribution de SPC3 et proSAAS est hautement reliée. Les résultats obtenus après co-localisation démontrent le même concept que pour 7B2 et SPC2 (SEIDEL et al, 1998). Tout comme 7B2 en relation avec SPC2, proSAAS a une plus grande distribution que SPC3. Dans les deux études, l'expression de proSAAS ou 7B2 est beaucoup plus forte que pour la convertase à laquelle on l'associe, soit SPC3 ou SPC2 respectivement. Ces résultats suggèrent que proSAAS a potentiellement d'autres actions ou fonctions que celles connues sur la convertase SPC3. Comme il est connu que proSAAS est hautement maturé (MZHAVIA et al, 2001), cela confirme la possibilité pour lui d'être un précurseur neuropeptidique. Par contre, cette fonction serait confirmée par la démonstration de récepteurs dont les voies de signalisation seraient activées par la présence de peptides dérivés du précurseur proSAAS.

Même si nos résultats suggèrent fortement que proSAAS est un excellent marqueur de cellules neuroendocrine, nous avons observé certaines localisations atypiques qui suggèrent certaines divergences de ce concept. Dans le système gastro-intestinal, plus spécifiquement au niveau de l'iléon, nous avons observé une très forte expression de proSAAS dans les cellules ganglionnaires de la couche musculaire externe. De plus, au niveau des couches internes de l'épithélium intestinal où SPC3 est connu pour être exprimé dans les cellules endocrines (SCOPSI et al, 1995; HORSCH et al, 1997), l'expression de proSAAS n'a pas pu être détectée. Ainsi, si proSAAS joue un

rôle important dans l'inhibition temporelle de SPC3, cela ne pourrait pas se produire au niveau des cellules endocrines de l'intestin. On ne connaît pas l'effet qu'aurait un manque en proSAAS sur l'activité de SPC3 sur ces cellules endocrines. Nous avons également relevé l'expression significative de proSAAS au niveau des testicules et plus spécifiquement dans les cellules interstitielles, possiblement dans les cellules de Leydig. Les cellules de Leydig ont été rapportées pour avoir la capacité d'exprimer la prodynorphin (DOUGLASS et al, 1987), la proenképhaline (GARRET & DOUGLASS 1989), la proopiomélanocortine (PINTAR et al, 1984; CHEN et al, 1984) et l'oxytocine (GULDENAAR & PICKERING 1985). Par contre, aucun effet de proSAAS sur la maturation de ces hormones n'a encore été vérifié.

En plus du résultat surprenant obtenu au niveau du petit intestin, nous avons également observé un résultat irrégulier au niveau des cellules de la glomérulosa, dans le cortex surrénalien, la couche externe de la glande surrénale qui est responsable de la production d'aldostérone. SPC3 n'étant pas exprimé au niveau de la glomérulosa, le rôle de proSAAS à ce niveau reste également inconnu. La co-localisation de proSAAS et SPC3 a donc permis d'établir que SPC3 est presque toujours co-exprimé avec proSAAS. Au niveau de l'intestin cette règle ne s'applique pas, tel que démontré à la figure 13. Par contre, proSAAS peut être exprimé à des hauts niveaux sans qu'il y ait présence de SPC3 et ce, peu importe le tissu. Ceci confirme la possibilité pour proSAAS d'avoir une ou des activités complémentaires à une inhibition exclusive de SPC3.

Par le passé, plusieurs études ont voulu mettre à jour la présence d'inhibiteur de convertases dans le but d'étudier l'absence partielle ou totale d'activité d'un ou plusieurs

des membres de cette famille. Une telle déficience par inhibition permettrait d'étudier l'application de ces inhibiteurs du point de vue thérapeutique. Jusqu'à maintenant, il existe peu d'informations sur les inhibiteurs physiologiques des convertases. Le C-T peptide de la protéine neuroendocrine 7B2 inhibe SPC2 (LINDBERG et al, 1995; ZHU et al, 1996) tandis que le domaine C-terminal de la nouvelle protéine neuroendocrine proSAAS inhibe SPC3 (FRICKER et al, 2000; MZHAVIA et al, 2000; CAMERON et al, 2000). De plus, il a été démontré que les pro-peptides des subtilisines représentent des inhibiteurs intra-moléculaires efficaces (ZHU et al, 1989). Il a aussi été montré que les peptides courts dérivés de proSAAS sont de meilleurs inhibiteurs de SPC3 que le précurseur proSAAS complet. La liaison forte qui attache proSAAS à SPC3, ainsi que l'inhibition qui en résulte, démontre la possibilité d'un fonctionnement régulé de cette inhibition. Deux phénomènes sont possibles dans ce cas, le premier consisterait en un clivage du site lysine-arginine (KR) par SPC3 lui-même. Ce clivage lent au C-terminal inhibiteur de proSAAS serait fait d'une façon semblable à SPC2 qui clive le peptide inhibiteur 7B2 (ZHU et al, 1996). Une deuxième possibilité serait que d'autres SPCs pourraient cliver les résidus KR au niveau du site inhibiteur du peptide de 4 KDa (PEN/LEN) pour générer des formes plus petites. Ces formes sont en effet détectées dans des cellules et au cerveau de souris normales (MZHAVIA et al, 2001).

Malgré son effet inhibiteur, pour produire une forme active de SPC2, le peptide 7B2 doit être co-exprimé avec la convertase (ZHU & LINDBERG 1995). Contrairement à SPC2, SPC3 est exprimé sous forme active dans des systèmes d'expression n'exprimant pas de proSAAS (BENJANNET et al, 1991; BOUDREAULT et al, 1998). C'est pourquoi nous avons voulu produire par co-transfection SPC3 et

proSAAS dans un système d'expression à grande échelle utilisant des cellules d'insecte, soit de *Drosophila* (système D.E.S.). Nous voulions ainsi vérifier la possibilité d'obtenir une meilleure forme active de SPC3 comme c'est le cas lors de double transfection entre le peptide 7B2 et SPC2.

De façon générale, cette étude a permis de démontrer que la présence de proSAAS et de SPC3 dans le milieu de culture ne démontre aucune baisse ou augmentation de l'activité enzymatique de SPC3 (voir figure 17). Bien que nous nous attendions à démontrer une certaine inhibition de l'activité SPC3 par proSAAS, il est possible d'expliquer le phénomène. Les extractions d'ARN (Figure 14) ont clairement démontré que proSAAS et SPC3 sont exprimés en quantités égales. Dans l'étude du contenu en protéines (Figure 15), SPC3 est retrouvé sous ses deux formes attendues de 66 et 87 kDa (SEIDAH et al, 1991). La confirmation de ce résultat a été appuyée par l'étude de blocage de l'anticorps anti-SPC3 (Figure 16) qui démontre que les deux bandes observées de 66 et 87 kDa (Figure 15) représentent bien l'expression de SPC3 par les cellules S2. Ces deux affirmations permettent de croire que l'absence d'inhibition n'est probablement pas due au manque de l'un ou l'autre des deux éléments transfectés même s'il n'a pu être démontré que proSAAS est bien exprimé en protéines et non pas seulement en ARNm. En fait, comme les tests d'activité enzymatique sont faits sur le milieu de culture, donc après sécrétion du contenu de la cellule dans le milieu, plusieurs raisons sont possibles. Tout d'abord, au niveau des cellules S2, il est probable qu'il y ait présence d'enzymes endogènes capable de maturer proSAAS autant pour le clivage aux divers sites basiques que par l'enlèvement du site basique par une carboxypeptidase endogène avec une activité CPE-like. De cette façon, il se peut qu'au

niveau du milieu de culture, on retrouve des fragments de proSAAS qui sont inactifs sur SPC3 puisqu'il est déjà connu que les peptides dérivés de proSAAS chez qui les résidus basiques ont été éliminés n'ont aucune inhibition sur SPC3 (MZHAVIA, 2001). Il est également probable que proSAAS ait été maturé par SPC3 co-transfecté dans la cellule. Ainsi, les produits de sécrétions ne seraient en fait que des peptides dérivés de proSAAS et que les cellules S2 expriment peut-être une enzyme avec une activité CPE-like qui a éliminé les résidus basiques en C-terminal des peptides dérivés de proSAAS. Comme aucune évidence de la présence de proSAAS au niveau du milieu de culture n'a pu être établie par le manque d'anticorps efficaces pour la détection de proSAAS, il se peut également que l'ARNm de proSAAS mis en évidence (Figure 14) ne soit pas traduit (ARN → protéine) ou que la protéine produite soit dirigée vers des structures tels que des lysosomes et soit ainsi dégradée. Cette dernière possibilité reste par contre improbable, mais tout aussi possible que les autres raisons. En fait, la raison la plus plausible du manque d'inhibition de proSAAS sur SPC3 semble beaucoup plus pencher sur le manque de résidus basiques inhibiteur en C-terminal du peptide.

Cela amène une problématique (Figure 17) à savoir comment et quand proSAAS est-il maturé en son site inhibiteur dans un système endocrinien? Est-il maturé tôt dans la voie de sécrétion au niveau du réseau trans-golgien ou bien tard dans les granules de sécrétions matures? Comme SPC3 est maturé rapidement au niveau du TGN, il peut paraître évident que proSAAS sera lui aussi maturé à ce niveau. En fait, si proSAAS agit sur SPC3 comme le fait 7B2 sur SPC2, il est possible de croire que proSAAS n'aura qu'une action transitoire inhibitrice très courte sur SPC3 et cela au TGN. Par contre, si le site inhibiteur de proSAAS est protégé de la maturation, proSAAS aura une action

inhibitrice sur SPC3 jusqu'à un clivage plus tard dans la voie de sécrétion. Ce dernier cas semble peu probable puisqu'il est connu que SPC3 a son activité au niveau du golgi et dans les granules immatures. En fait, des études de protéolyse de la POMC et de la pro-enképhaline ont démontré que le clivage par SPC3 a lieu avant d'atteindre les granules de sécrétion (ZHOU et al, 1993; JOHANNING et al, 1996; MILGRAM & MAINS 1994). Donc, si proSAAS est mûré tardivement dans la voie de sécrétion, il apparaît peu probable qu'il ait une action inhibitrice *in vivo* sur SPC3. Si proSAAS est mûré de façon précoce dans les voies de sécrétion, cela permet de croire en une action potentielle sur SPC3 tel qu'observé pour 7B2 sur SPC2.

Comme il reste à savoir quel rôle la CPE jouerait au niveau de l'inhibition de SPC3 par proSAAS, il faudrait donc vérifier l'effet qu'aurait un inhibiteur de la CPE sur un modèle *in vivo* de type endocrinien. A savoir si l'inhibition de SPC3 serait conservée tout au long de la voie de sécrétion puisque proSAAS comporterait toujours des acides aminés basiques en C-terminal responsables du potentiel inhibiteur.

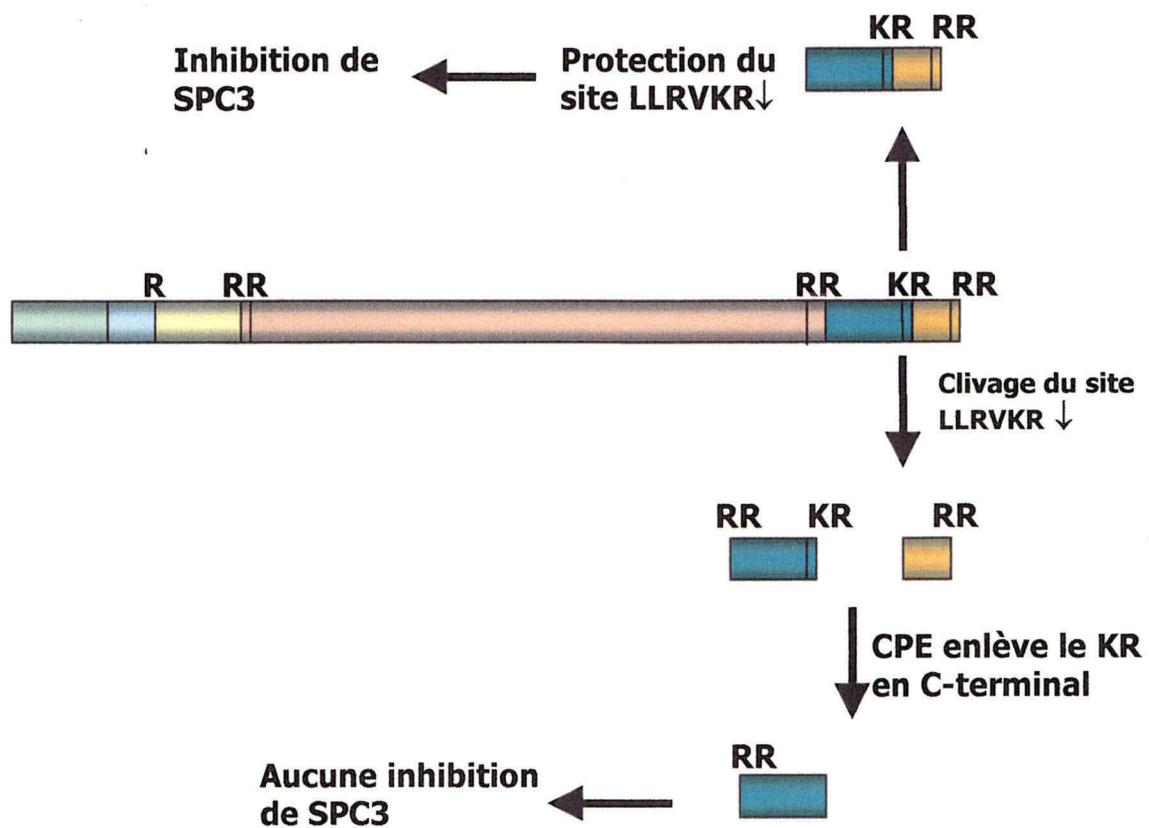


Figure 18. Représentation hypothétique du mode d'action de proSAAS sur SPC3

Modèle hypothétique de clivage de proSAAS influençant son activité inhibitrice sur SPC3. La première voie implique la protection du site de clivage du peptide inhibiteur. Ainsi l'inhibition de SPC3 par proSAAS s'effectuera. La deuxième voie implique un clivage précoce du site inhibiteur (LLRVKR↓) et enlèvement rapide des acides aminés basiques (KR) par la carboxypeptidase E (CPE). De cette façon, proSAAS n'inhibe pas SPC3.

CONCLUSIONS

L'étude effectuée avait pour but tout d'abord de déterminer la localisation de l'expression des ARNm de proSAAS. Par la suite, cette étude devait démontrer si oui ou non le peptide neuroendocrine proSAAS était co-exprimé avec SPC3. Finalement, l'étude de co-expression de SPC3 et proSAAS visait à déterminer l'effet d'une co-production de SPC3 et proSAAS dans un système d'expression d'insecte.

L'étude présentée ici a permis de démontrer la présence d'un nouveau peptide de type neuroendocrine dans plusieurs tissus. En fait, il a été établi que proSAAS est exprimé dans des régions à fortes concentrations neuronales dans le cerveau, tels que l'hippocampe, le noyau paraventriculaire et le noyau supraoptique. De plus, il a été démontré que proSAAS est retrouvé dans divers tissus périphériques endocrines et non-endocrines tels que l'hypophyse, la glande surrénale, les testicules et les intestins. Ces résultats permettent d'affirmer que proSAAS semble bel et bien, par son expression à fortes concentration dans les neurones et dans les cellules endocrines, faire partie de la famille des granines.

L'étude de co-localisation entre SPC3 et proSAAS a permis de démontrer que SPC3 est toujours co-exprimé avec proSAAS au cerveau. De même qu'il est possible de retrouver du proSAAS dans certaines cellules qui n'expriment pas SPC3. Une seule divergence à ce niveau est apparue au niveau de l'intestin puisque du SPC3 a été

retrouvé dans des types cellulaires différents de ceux où du proSAAS a été retrouvé dans ce tissu. Toutes ces données appuient la possibilité pour proSAAS d'avoir une activité complémentaire à celle retrouvée sur SPC3. De même que la présence de SPC3 dans des cellules n'exprimant pas de proSAAS permet de croire que SPC3 ne nécessite pas proSAAS pour être exprimé. Il reste à déterminer si la forme de SPC3 produite dans ces cellules est active ou non.

Par les études de co-transfection, nous avons pu démontrer que la co-expression de SPC3 et proSAAS n'améliore pas la production d'une forme plus active de SPC3. De même que cette étude permet de croire en une fonction transitoire de proSAAS dans les cellules où elles sont naturellement exprimées par le fait que SPC3 n'est pas inhibé par proSAAS lorsque sécrété.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Robert Day pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait connaître les joies du travail en laboratoire et surtout de m'avoir permise d'y apprendre une technique qui lui est chère, l'hybridation *in situ*. Il m'a grandement aidé à réaliser mon projet de maîtrise.

Je tiens également à remercier les Drs Pedro D'Orléans-Juste du département de pharmacologie et Jean Morisset du département de médecine/service de gastroentérologie de la faculté de Médecine pour avoir accepté d'évaluer et de corriger ce mémoire. De plus, j'aimerais remercier le Dr Alain Cadieux du département de pharmacologie pour m'avoir permis d'utiliser son cryostat. Je désire également remercier les Fonds institutionnels de la faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke (FUS) pour la bourse que j'ai obtenue durant ma première année de maîtrise.

Un gros merci également à Xue Wen Yuan pour son expertise technique dans la réalisation des buvardages de type Northern ainsi que pour m'avoir fourni les cellules S2 nécessaires à la réalisation de mes transfections.

Un énorme merci à mes partenaires (étudiants, stagiaires et techniciennes) de laboratoire pour leur apport durant les 2 dernières années passées au laboratoire. Un

merci spécial à Éliane et Marie-Claude qui ont été pour moi des supports moraux hors pair tout au long de ses deux années.

Finalement, merci à tous les membres du département de pharmacologie, étudiants, professeurs et personnel administratif qui ont, de près ou de loin, contribué à ma formation et à la réussite de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- APLETALINA, E., APPEL, J., LAMANGO, N.S., HOUGHTEN, R.A., LINDBERG, I.
(1998) Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *J Biol Chem.* **273**:26589-95, Oct 9.
- AULD, D .S. (1998a) Carboxipeptidase A. In. *Handbook of Protéolytic Enzymes*, pp.1321-1326, Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (eds.) Academic Press, San Diego
- AULD, D .S. (1998b) Carboxipeptidase A. In. *Handbook of Protéolytic Enzymes*, pp.1326-1328, Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (eds.) Academic Press, San Diego
- AVILES F.X., VENDRELL, J. (1998) Carboxipeptidase A. In. *Handbook of Protéolytic Enzymes*, pp.1333-1335, Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (eds.) Academic Press, San Diego
- AYOUBI, T.A., VAN DUIJNHOFEN, H.L., VAN DE VEN, W.J., JENKS, B.G., ROUBOS, E.W., MARTENS, G.J. (1990) The neuroendocrine polypeptide 7B2 is a precursor protein. *J Biol Chem* **265**:15644-7
-

- BAUERFEIND, R., HUTTNER, W.B. (1993) Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles [published erratum appears in *Curr Opin Cell Biol* 1993 Dec; 5(6): 1106] *Curr Opin Cell Biol.* **5**:628-35
- BENJANNET, S., RONDEAU, N., DAY, R., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *P Natl Acad Sci USA.* **88**:3564-8
- BENJANNET, S., SAVARIA, D., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G. (1995). 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. *J Neurochem.* **64**:2303-11
- BENNETT, D.L., BAILYES, E.M., NIELSEN, E., GUEST, P.C., RUTHERFORD, N.G., ARDEN, S.D., HUTTON, J.C. (1992) Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J Biol Chem.* **267**:15229-36
- BENNETT, H.P.J. (1991) Glycosylation, phosphorylation and sulfation of peptide hormones and their precursors. In: *Peptide biosynthesis and processing* (Fricker LD, ed), pp111-140. Boca Raton: CRC
- BERGERON, F., LEDUC, R., DAY, R. (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* **24**:1-22

- BOUDREAULT, A., GAUTHIER, D., RONDEAU, N., SAVARIA, D., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., LAZURE, C. (1998) Molecular characterization, enzymatic analysis, and purification of murine proprotein convertase-1/3 (PC1/PC3) secreted from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Prot Exp Purif.* **14**:353-66
- BRADBURY, A.F., SMYTH, D.G. (1991) Modification of the N- and C-termini of bioactive peptides : amidation and acetylation. In: *Peptide biosynthesis and processing* (Fricker LD, ed), pp199-230. Boca Raton: CRC
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
- BRAKS, J.A.M., MARTENS, G.M. (1994) 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* **78**:263-273
- BRAKS, J.A., VAN HORSSSEN, A.M., MARTENS, G.J. (1996). Dissociation of the complex between the neuroendocrine chaperone 7B2 and prohormone convertase PC2 is not associated with proPC2 maturation. *Eur J Biochem.* **238**: 505-10.
- BRUZZANITI, A., GOODGE, K., JAY, P., TAVIAUX, S.A., LAM, M.H., BERTA, P., MARTIN, T.J., MOSELEY, J.M., GILLESPIE, M.T. (1996) PC8 [corrected], a new

member of the convertase family. [erratum appears in Biochem J 1996 Jun 15;316(Pt 3):1007]. Biochem J. **314**:727-31

BURGESS, T.L., KELLY, R.B. (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. Ann. Rev. Cell Biol. **3**:243-93

CAMERON, A., FORTENBERRY, Y., LINDBERG, I. (2000) The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. FEBS Lett. **473**:135-8

CETIN, Y., GRUBE, D. (1991) Immunoreactivities for chromogranin A and B, and secretogranin II in the guinea pig entero-endocrine system: cellular distributions and intercellular heterogeneities. Cell Tissue Res **264**:231-41

CHAN, S.J., OLIVA, A.A. JR., LAMENDOLA, J., GRENS, A., BODE, H., STEINER, D.F. (1992) Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. Proc Natl Acad Sci USA. **89**:6678-82

CHEN, C.L.C., MATHER, J.P., MORRIS, P.L., BARDIN, C.W. (1984) Expression of proopiomelanocortin-like gene in the testis and epididymis. Proc Natl Acad Sci USA. **81**:5672-5

- COLEMAN, DL., EICHER, E.M. (1990) Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered.* **81**:424-7
- COOL, D.R., NORMANT, E., SHEN, F., CHEN, H.C., PANNELL, L., ZHANG, Y., LOH, Y.P. (1997) Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell.* **88**:73-83
- CREEMERS, J.W., SIEZEN, R.J., ROEBROEK, A.J., AYOUBI, T.A., HUYLEBROECK, D., VAN DE VEN, W.J. (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* **268**:21826-34
- DAY, R., SCHAFER, M.K.H., WATSON, S.J., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G. (1992) Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol. Endocrinol.* **6** : 485-497
- DAY, R., SCHAFER, M.K., CULLINAN, W.E., WATSON, S.J., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G. (1993) Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett.* **149**:27-30
- DAY, R. and DONG, W. (1996) Localisation of low-abundance mRNA using double-label *in situ* hybridization histochemistry as applied to the mapping of processing enzymes. *Cell Vision*, **3** : 237-243

- DAY, R., LAZURE, C., BASAK, A., BOUDREAULT, A., LIMPERIS, P., DONG, W., LINDBERG I (1998) Prodynorphin processing by proprotein convertase 2: cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxipeptidase activity. *J. Biol. Chem.* **273** :829-836
- DENAULT, J.B., LEDUC, R. (1996) Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett.* **379**:113-6
- DEVI, L. (1991) Peptide processing at monobasic sites. In : *Peptide Biosynthesis and processing* (Fricker LD, ed), pp175-198. Boca Raton: CRC
- DONG, W., MARCINKIEWICZ, M., VIEAU, D., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G., DAY, R. (1995) Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J Neurosci* **15**:1778-96
- DONG, W., SEIDEL, B., MARCINKIEWICZ, M., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G., DAY, R. (1997) Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J Neurosci.* **17**:563-75

- DOUGLASS, J., COX, B., QUINN, B., CIVELLI, O., HERBERT, E. (1987) Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology*. **120**:707-13
- DUPUY, A., LINDBERG, I., ZHOU, Y., AKIL, H., LAZURE, C., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G., DAY, R. (1994) Processing of prodynorphin by the prohormone convertase PC1 results in high molecular weight intermediate forms. Cleavage at a single arginine residue. *FEBS Lett*. **337**:60-5
- FRICKER, L.D., SNYDER, S.H. (1982) Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**:3886-90
- FRICKER, L.D. (1988) Carboxypeptidase E. *Annu Rev Physiol*. **50**:309-21
- FRICKER, L.D. (1991) Peptide processing exopeptidases: amino- and carboxypeptidases involved with peptide biosynthesis. In: *Peptide biosynthesis and processing* (Fricker LD, ed.), pp199-230. Boca Raton: CRC
- FRICKER, L.D., BERMAN, Y.L., LEITER, E.H., DEVI, L.A. (1996) Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation. Effect on peptide processing. *J Biol Chem*. **271**:30619-24

- FRICKER, L.D., LEITER, E.H., (1999) Peptides, enzymes and obesity: new insights from a 'dead' enzyme. *Trends Biochem Sci.* **24**:390-3
- FRICKER, L.D., MCKINZIE, A.A., SUN, J., CURRAN, E., QIAN, Y., YAN, L., PATTERSON, S.D., COURCHESNE, P.L., RICHARDS, B., LEVIN, N., MZHAVIA, N., DEVI, L.A., DOUGLASS, J. (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci.* **20**:639-48
- FULLER, R.S., BRAKE, A.J., THORNER, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science.* **246**:482-6
- GARRETT, J.E., DOUGLASS, J.O. (1989) Human chorionic gonadotropin regulates expression of the proenkephalin gene in adult rat Leydig cells. *Mol Endocrinol.* **3**:2093-100
- GOODMAN, L.J., GORMAN, C.M. (1994) Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun.* **201**:795-804
- GULDENAAR, S.E.F., PICKERING, B.T. (1985) Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis. *Cell Tissue Res* **240**:485-7
-

- HENDRIKS D.F. (1998) Carboxipeptidase U. In. Handbook of Protéolytic Enzymes, pp.1328-1330, Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (eds.) Academic Press, San Diego
- HORSCH, D., DAY, R., SEIDAH, N.G., WEIHE, E., SCHÄFER, M.K.H. (1997) Immunohistochemical localization of the pro-peptide processing enzymes PC1/PC3 and PC2 in the human anal canal. *Peptides* **18**:755-760
- HSI, K.L., SEIDAH, N.G., DE SERRES, G., CHRETIEN, (1982) M. Isolation and NH2-terminal sequence of a novel porcine anterior pituitary polypeptide. Homology to proinsulin, secretin and Rous sarcoma virus transforming protein TVFV60. *FEBS Lett.* **147**:261-6.
- HUTTNER, W.B., GERDES, H.H., ROSA, P. (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci.* **16**:27-30
- IGUCHI, H., CHAN, J.S., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M. (1984) Tissue distribution and molecular forms of a novel pituitary protein in the rat. *Neuroendocrinology.* **39**:453-8
- JOHANNING, K., MATHIS, J.P., LINDBERG, I. (1996) Role of PC2 in proenkephalin processing: antisense and overexpression studies. *J Neurochem.* **66**:898-907

- JULIUS, D., BRAKE, A., BLAIR, L., KUNISAWA, R., THORNER, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*. **37**:1075-89
- KEMMLER, W., STEINER, D.F., BORG, J. (1973) Studies on the conversion of proinsulin to insulin. 3. Studies in vitro with a crude secretion granule fraction isolated from rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. **248**:4544-51
- KIEFER, M.C., TUCKER, J.E., JOH, R., LANDSBERG, K.E., SALTMAN, D., BARR, P.J. (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA & Cell Biol*. **10**:757-69
- KRISCH, K., HORVAT, G., KRISCH, I., WENGLER, G., ALIBEIK, H., NEUHOLD, N., ULRICH, W., BRAUN, O. (1988) Hochmeister M. Immunochemical characterization of a novel secretory protein (defined by monoclonal antibody HISL-19) of peptide hormone producing cells which is distinct from chromogranin A, B, and C. *Lab Invest*. **58**:411-20
- LAMANGO, N.S., APLETALINA, E., LIU, J., LINDBERG, I. (1999) The proteolytic maturation of prohormone convertase 2 (PC2) is a pH-driven process. *Arch Biochem Biophys*. **362**:275-82.
-

- LEDUC, R., MOLLOY, S.S., THORNE, B.A., THOMAS, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem.* **267**:14304-8
- LEE RW. HUTTNER WB. (1983) Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J Biol Chem.* **258**:11326-34
- LEITER, E.H. (1997) Carboxypeptidase E and obesity in the mouse. *J Endocrinol* **155**:211-4
- LINDBERG, I., HUTTON, J.C. (1991) Peptide processing proteinases with selectivity for paired basic residues. In : *Peptide Biosynthesis and processing* (Fricker LD, ed), pp141-174. Boca Raton : CRC
- LINDBERG, I., VAN DEN HURK, W.H., BUI, C., BATIE, C.J. (1995) Enzymatic characterization of immunopurified prohormone convertase 2: potent inhibition by a 7B2 peptide fragment [published erratum appears in *Biochemistry* 1995 **34**:7780] *Biochemistry* **34**:5486-5493
- LINDBERG, I., Tu, B., Muller, L., Dickerson, I.M. (1998) Cloning and functional analysis of *C. elegans* 7B2..*DNA Cell Biol.* **17**, 727-734

- LUSSON, J., VIEAU, D., HAMELIN, J., DAY, R., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G.,
(1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate
proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl
Acad Sci USA*. **90**:6691-5
- MAINS, R.E., MILGRAM, S.L., KEUTMANN, H.T., EIPPER, B.A. (1995) The NH₂-
terminal proregion of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase facilitates
the secretion of soluble proteins. *Mol Endocrinol*. **9**:3-13
- MARCINKIEWICZ, M., BENJANNET, S., CANTIN, M., SEIDAH, N.G.,
CHRETIEN, M. (1986) CNS distribution of a novel pituitary protein '7B2':
localization in secretory and synaptic vesicles. *Brain Res*. **380**:349-56
- MARCINKIEWICZ, M., BENJANNET, S., SEIDAH, N.G., CANTIN, M.,
CHRETIEN, M. (1987) The pituitary polypeptide "7B2" is associated with LH/FSH
and TSH cells and is localized within secretory vesicles. *Cell Tissue Res*. **250**:205-
14
- MARTENS, G.J., BRAKS, J.A., EIB, D.W., ZHOU, Y., LINDBERG, I. (1994) The
neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone
convertase PC2. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**:5784-5787

- MATTHEWS, G., SHENNAN, K.I., SEAL, A.J., TAYLOR, N.A., COLMAN, A., DOCHERTY, K. (1994) Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J Biol Chem.* **269**:588-92
- MBIKAY, M., GRANT, S.G., SIROIS, F., TADROS, H., SKOWRONSKI, J., LAZURE, C., SEIDAH, N.G., HANAHAN, D., CHRETIEN, M. (1989) cDNA sequence of neuroendocrine protein 7B2 expressed in beta cell tumors of transgenic mice. *Int J Pept Prot Res.* **33**:39-45
- MILGRAM, S.L., MAINS, R.E. (1994) Differential effects of temperature blockade on the proteolytic processing of three secretory granule-associated proteins. *J Cell Sci.* **107**:737-45
- MOLLOY, S.S., ANDERSON, E.D., JEAN, F., THOMAS, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* **9**:28-35
- MULLER, L., ZHU, X., LINDBERG, I. (1997) Mechanism of the facilitation of PC2 maturation by 7B2: involvement in ProPC2 transport and activation but not folding. *J Cell Biol.* **139**:625-38
- MULLER, L., LINDBERG, I. (1999) The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog Nucleic Acid Res.* **63**:69-108,.
-

- MZHAVIA, N., BERMAN, Y., CHE, F.Y., FRICKER, L.D., DEVI, L.A. (2001)
ProSAAS Processing in Mouse Brain and Pituitary. *J Biol Chem.* **276**:6207-6213
- NAGGERT, J.K., FRICKER, L.D., VARLAMOV, O., NISHINA, P.M., ROUILLE, Y.,
STEINER, D.F., CARROLL, R.J., PAIGEN, B.J., LEITER, E.H. (1995)
Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E
mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet.* **10**:135-42
- NAKAGAWA, T., HOSAKA, M., TORII, S., WATANABE, T., MURAKAMI, K.,
NAKAYAMA, K. (1993) Identification and functional expression of a new member
of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural
similarity to PACE4. *J Biochem.* **113**:132-5
- NAKAYAMA, K., KIM, W.S., TORII, S., HOSAKA, M., NAKAGAWA, T.,
IKEMIZU, J., BABA, T., MURAKAMI, K. (1992) Identification of the fourth
member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2
protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem.* **267**:5897-900
- NATORI, S., HUTTNER, W.B. (1994) Peptides derived from the granins
(chromogranins/secretogranins). *Biochimie.* **76**:277-282
- OTTIGER, H.P., BATTENBERG, E.F., TSOU, A.P., BLOOM, F.E., SUTCLIFFE, J.G.
(1990) 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel

chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci.* **10**:3135-47

OZAWA, H., TAKATA, K. (1995) The granin family--its role in sorting and secretory granule formation. *Cell Struct Funct.* **20**:415-20

PAQUET, L., RONDEAU, N., SEIDAH, N.G., LAZURE, C., CHRETIEN, M., MBIKAY, M. (1991) Immunological identification and sequence characterization of a peptide derived from the processing of neuroendocrine protein 7B2. *FEBS Lett.* **294**:23-6

PAQUET, L., BERGERON, F., BOUDREAULT, A., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., MBIKAY, M., LAZURE, C. (1994) The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase. *J Biol Chem.* **269**:19279-85

PINTAR, J.E., SCHACHTER, B.S., HERMAN, A.B., DURGERIAN, S., KRIEGER, D.T. (1984) Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science.* **225**:632-4

PROCHAZKA, M., GASKINS, H.R., LEITER, E.H., KOCH-NOLTE, F., HAAG, F., THIELE, H.G. (1991) Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogenetics.* **33**:152-6

QIAN, Y., DEVI, L.A., MZHAVIA, N., MUNZER, S., SEIDAH, N.G., FRICKER, L.D. (2000) The C-terminal region of proSAAS is a potent inhibitor of prohormone convertase 1. *J Biol Chem.* **275**:23596-601

ROEBROEK, A.J., SCHALKEN, J.A., BUSSEMAKERS, M.J., VAN HEERIKHUIZEN, H., ONNEKINK, C., DEBRUYNE, F.M., BLOEMERS, H.P., VAN DE VEN, W.J. (1986) Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Molec Biol Rep.* **11**:117-25

ROSA, P., ZANINI, A. (1981) Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. II. Sulfated and glycosylated polypeptides. *Mol Cell Endocrinol.* **24**:181-93

ROUILLE, Y., MARTIN, S., STEINER, D.F. (1995) Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem.* **270**:26488-96

ROVERE, C., VIALE, A., NAHON, J., KITABGI, P. (1996) Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese fat/fat mice. *Endocrinology.* **137**:2954-8

- SAYAH, M., FORTENBERRY, Y., CAMERON, A., LINDBERG, I. (2001) Tissue distribution and processing of proSAAS by proprotein convertases. *J Neurochem.* **76**:1833-41
- SCHAFER, M.K., DAY, R., CULLINAN, W.E., CHRETIEN, M., SEIDAH, N.G., WATSON, S.J. (1993) Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J Neurosci.* **13**:1258-79
- SCHAFER, M.K. , DAY, R. (1994) In situ hybridization techniques to study processing enzyme expression at the cellular level. *Methods, Enzymol.* **23**: 16-44
- SCHNEIDER, F.H., SMITH, A.D., WINKLER, H. (1967) Secretion from the adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. *Brit J Pharmacol.* **31**:94-104
- SCHECHTER, I., BERGER, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* **27**:157-62
- SCOPSI, L., GULLO, M., RILKE, F., MARTIN, S., STEINER, D.F. (1995) Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *Clin Endocrinol Metab* **80**:294-301
- SEIDAH, N.G., GASPAR, L., MION, P., MARCINKIEWICZ, M., MBIKAY, M., CHRETIEN, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding

candidates for pro-hormone processing proteinases. [erratum appears in DNA Cell Biol Dec;9(10):789]. DNA Cell Biol. 9:415-24

SEIDAH, N.G., MARCINKIEWICZ, M., BENJANNET, S., GASPAR, L., BEAUBIEN, G., MATTEI, M.G., LAZURE, C., MBIKAY, M., CHRETIEN, M. (1991) Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. Mol Endocrinol. 5:111-122

SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., DAY, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: Divergent or shared functions. Biochimie. 76:197-209

SEIDAH, N.G., HAMELIN, J., MAMARBACHI, M., DONG, W., TARDOS, H., MBIKAY, M., CHRETIEN, M., DAY, R. (1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. Proc Natl Acad Sci USA. 93:3388-93

SEIDEL, B., DONG, W., SAVARIA, D., ZHENG, M., PINTAR, J.E., DAY, R. (1998) Neuroendocrine protein 7B2 is essential for proteolytic conversion and activation of proprotein convertase 2 in vivo. DNA Cell Biol. 17:1017-29

- SIGAFOOS, J., CHESTNUT, W.G., MERRILL, B.M., TAYLOR, L.C., DILIBERTO, E.J. JR, VIVEROS, O.H. (1993) Identification of a 7B2-derived tridecapeptide from bovine adrenal medulla chromaffin vesicles. *Cell Mol Neurobiol.* **13**:271-8
- SMEEKENS, S.P., STEINER, D.F. (1991) Processing of peptide precursors. Identification of a new family of mammalian proteases. *Cell Biophysics.* **19**:45-55
- SMEEKENS, S.P., MONTAG, A.G., THOMAS, G., ALBIGES-RIZO, C., CARROLL, R., BENIG, M., PHILLIPS, L.A., MARTIN, S., OHAGI, S., GARDNER, P. (1992) Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**:8822-6
- SONG, L., FRICKER, L.D. (1995) Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary. *J Biol Chem.* **270**:25007-13
- SPRINGMAN, E.B. (1998) Mast cell carboxipeptidase. In. *Handbook of Protéolytic Enzymes*, pp.1330-1333, Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (eds.) Academic Press, San Diego
- SUPATTAPONE, S., FRICKER L.D., SNYDER, S.H. (1984) Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, « enkephalin convertase ». *J Neurochem.* **42** : 1017-23

STEINER, D.F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, **2**:31-39

TAKAHASHI, S., KASAI, K., HATSUZAWA, K., KITAMURA, N., MISUMI, Y.,
IKEHARA, Y., MURAKAMI, K., NAKAYAMA, K. (1993) A mutation of furin
causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo
cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **195**:1019-26

TAKAHASHI, S., NAKAGAWA, T., KASAI, K., BANNO, T., DUGUAY, S.J., VAN
DE VEN, W.J., MURAKAMI, K., NAKAYAMA, K. (1995) A second mutant
allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for
involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J Biol Chem*.
270:26565-9 Nov 3.

THOMAS, G., THORNE, B.A., THOMAS, L., ALLEN, R.G., HRUBY, D.E.,
FULLER, R., THORNER, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a
neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science*.**241**:226-30

THOMAS, L., LEDUC, R., THORNE, B.A., SMEEKENS, S.P., STEINER, D.F.,
THOMAS, G. (1991) Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a
model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of
neuroendocrine processing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**:5297-301

UDUPI, V., GOMEZ, P., SONG, L., VARLAMOV, O., REED, J.T., LEITER, E.H.,
FRICKER, L.D., GREELEY, G.H. JR., (1997) Effect of carboxypeptidase E

deficiency on progastrin processing and gastrin messenger ribonucleic acid expression in mice with the fat mutation. *Endocrinology*. **138**:1959-63

VAN DEN OUWELAND, A.M., VAN GRONINGEN, J.J., ROEBROEK, A.J.,
ONNEKINK, C., VAN DE VEN, W.J. (1989) Nucleotide sequence analysis of the human fur gene. *Nucleic Acids Res.* **17**:7101-2

VAN DEN OUWELAND, A.M., VAN DUIJNHOFEN, H.L., KEIZER, G.D.,
DORSSERS, L.C., VAN DE VEN, W.J. (1990) Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. [erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1990 Mar 11;18(5):1332]. *Nucleic Acids Res.* **18**:664-

VAN DE VEN, W.J., VOORBERG, J., FONTIJN, R., PANNEKOEK, H., VAN DEN
OUWELAND, A.M., VAN DUIJNHOFEN, H.L., ROEBROEK, A.J., SIEZEN,
R.J. (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **14**:265-75

VAN HORSSSEN, A.M., VAN DEN HURK, W.H., BAILYES, E.M., HUTTON, J.C.,
MARTENS, G.J., LINDBERG, I. (1995) Identification of the region within the neuroendocrine polypeptide 7B2 responsible for the inhibition of prohormone convertase PC2. *J Biol Chem.* **270**:14292-6

- VARLAMOV, O., FRICKER, L.D. (1998) Intracellular trafficking of metallocarboxypeptidase D in AtT-20 cells: localization to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface. *J Cell Sci.* **111**:877-85
- VARLAMOV, O., WU, F., SHIELDS, D., FRICKER, L.D. (1999) Biosynthesis and packaging of carboxypeptidase D into nascent secretory vesicles in pituitary cell lines. *J Biol Chem.* **274**:14040-5
- VIEAU, D., ROJAS-MIRANDA, A., VERLEY, J.M., LENNE, F., BERTAGNA, X. (1991) The secretory granule peptides 7B2 and CCB are sensitive biochemical markers of neuro-endocrine bronchial tumours in man. *Clin Endocrinol.* **35**:319-25
- WESTPHAL, C.H., MULLER, L., ZHOU, A., ZHU, X., BONNER-WEIR, S., SCHAMBELAN, M., STEINER, D.F., LINDBERG, I., LEDER, P. (1999) The neuroendocrine protein 7B2 is required for peptide hormone processing in vivo and provides a novel mechanism for pituitary Cushing's disease. *Cell.* **96**:689-700.
- WETSEL, W.C., HILL, D.F., OJEDA, S.R. (1996) Basic fibroblast growth factor regulates the conversion of pro-luteinizing hormone-releasing hormone (Pro-LHRH) to LHRH in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology.* **137**:2606-16
- WIEDENMANN, B., HUTTNER, W.B. (1989) Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of

neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch.* **58**:95-121

XIN, X., VARLAMOV, O., DAY, R., DONG, W., BRIDGETT, M.M., LEITER, E.H., FRICKER, L.D. (1997) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat carboxypeptidase D. *DNA Cell Biol.* **16**:897-909

ZANINI, A., ROSA, P. (1981) Characterization of adenohypophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. I. L-[³H]leucine-labeled polypeptides. *Mol Cell Endocrinol.* **24**:165-79

ZHENG, M., STRECK, R.D., SCOTT, R.E., SEIDAH, N.G., PINTAR, J.E. (1994) The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J Neurosci.* **14**:4656-73

ZHOU, A., BLOOMQUIST, B.T., MAINS, R.E. (1993) The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J Biol Chem.* **268**:1763-9.

ZHOU, A., MARTIN, S., LIPKIND, G., LAMENDOLA, J., STEINER, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem.* **273**:11107-14

ZHU, X., OHTA, Y., JORDAN, F., INOUE, M. (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature*. 339:483-4

ZHU, X., LINDBERG, I. (1995) 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *J Biol Chem* 129:1641-1650

ZHU, X., ROUILLE, Y., LAMANGO, N.S., STEINER, D.F., LINDBERG, I. (1996) Internal cleavage of the inhibitory 7B2 carboxyl-terminal peptide by PC2: a potential mechanism for its inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4919-24
